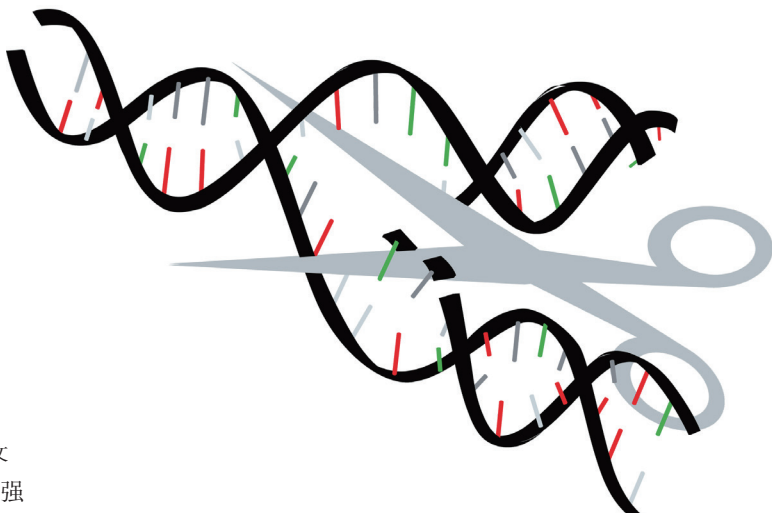


生命科学新革命： 基因编辑遇上克隆

撰文
吴志强



在中关村科技园区昌平园的北京希诺谷生物科技有限公司的繁育实验室，一只黑白黄相间，名叫“龙龙”的小狗正吮吸着“母亲”的乳汁。这位“母亲”是一只普通的比格犬，是生下“龙龙”的代孕妈妈。“龙龙”的供体细胞则是来自世界首例人类基因编辑疾病模型犬“苹果”。这条小狗是我国首例完全自主培育的体细胞克隆犬，更是世界首例基因编辑克隆犬。

疾病模型犬“苹果”

“苹果”是一只比格公犬，出生于2016年12月29日，20天后，另外一只比格犬“葫芦”也顺利出生了。经过近半年的观察与检测，这两只幼犬都表现出一些动脉粥样硬化的典型症状，如脂类代谢发生紊乱、高血脂等，这正是研究人员希望看到的。“苹果”就此成为世界首例动脉粥样硬化疾病模型犬。

动脉粥样硬化是一种老年多发性疾病。在众多的发病因素中，有个叫作APOE的关键基因，对脂质的运输和代谢发挥主要作用。如果敲

除犬的APOE基因，可使其血浆胆固醇升高，诱发粥样硬化病变。“苹果”得名也是缘于这个基因的读音。“苹果”和“葫芦”就是被敲除了这个基因，作为一种疾病模型动物，它俩可以被人类用来研究动脉粥样硬化疾病发生机理以及验证新药的疗效。

神奇的基因编辑技术

DNA是遗传信息载体，基因是一段具特定生物学功能的DNA片段，决定生物体生老病死等各种生命过程。基因编辑指根据科研或临床实际需要为目的基因（亦称靶DNA）进行插入、移除或替换等精确遗传操作，从而达到预定目的（引入或修复突变）的过程。鉴于基因在正常发育和疾病发生中的重要性，这项研究的意义不言而喻。基因编辑技术包括对于基因序列的修改，外源基因的导入整合以及特定基因的剔除。该技术是在遗传最底层的DNA水平进行了修改，所以相对于RNA干扰（RNAi）、蛋白质阻断剂等技术而言，它所带来的变化在生物体内是

长久性的，并且是可以遗传的。目前世界各国科学家已利用该技术成功培育出基因编辑牛、羊、猪、兔、小鼠、大鼠等动物以及人类胚胎。

那么，如何让功能基因想要就要、想没就没呢？研究人员利用了第三代最新基因编辑技术CRISPR/Cas9，它具有构建简单方便、基因打靶效率更高等特点。基因编辑技术应用在狗身上，实现基因敲除，在科学研究中时有发生。2015年，赖良学取得世界首例基因打靶犬，通过敲除犬肌肉生长抑制素基因，让其肌肉比普通犬更加发达，其中一条狗也因此得名“大力神”。该项科研成果为基因编辑犬的制备开辟了新方法。随后，希诺谷公司科研团队在赖良学带领下利用该技术，敲除犬APOE基因，首次将其应用于人类遗传疾病犬模型的培育，并取得成功。

犬体细胞克隆困难重重

在科技发展的今天，克隆并不是新鲜事。1996年第一只体细胞克隆绵羊“多利”诞生后，小鼠、牛、山羊、猪、猫、兔、骡、马、大鼠等多种哺乳动物的体细胞克隆相继获得成功。目前，动物体细胞克隆技术的主要环节包括：供体细胞的培养和准备、受体卵母细胞的体外成熟及去核、供体细胞核移植到去核的卵母细胞中、重构胚胎的融合和激活、重构胚胎的体外发育以及重构胚胎移植入受体动物中并妊娠产仔。世界首例体细胞克隆犬的成功获得，是把重构胚胎经过融合激活后不经过体外发育而直接移植入受体母犬中妊娠，进而发育成新个体。综合各种动物克隆方法和效率，犬体细胞克隆效率较低，难度大。

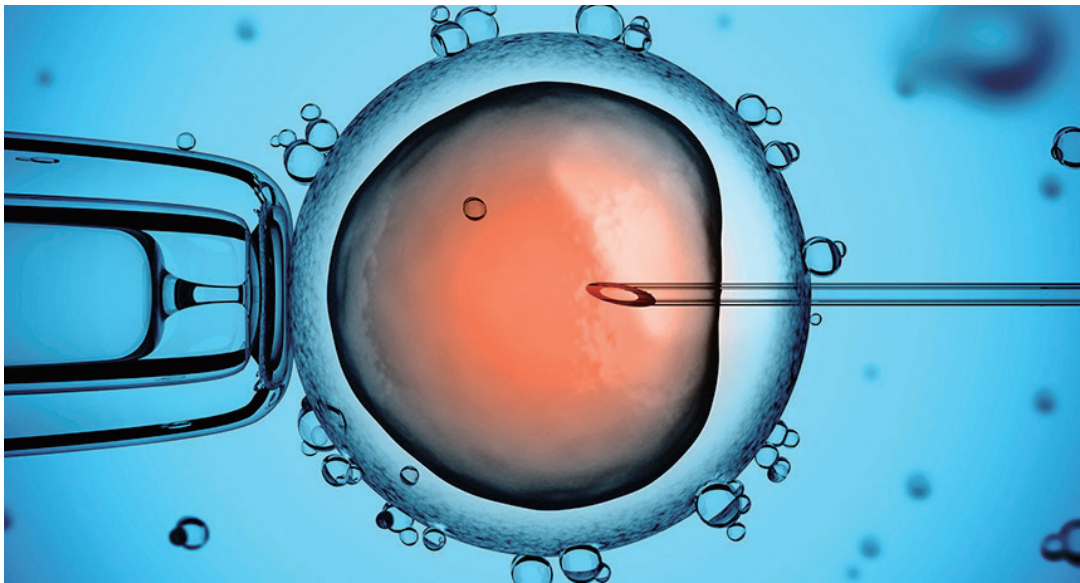
犬体细胞克隆难度大，主要是因为犬卵母细胞质量较差，且不易体外培养，犬卵母细胞体外成熟（IVM）效率比其他哺乳动物和实验动物低。犬卵母细胞中富含脂类物质，颜色较深，黏性很大，体细胞电融合效率不高，犬克隆胚胎制备技术难度大。至目前无利用体外成熟卵母细胞获取克隆犬的报道。为了充分利用宝贵资源，使用更多成熟卵母细胞进行克隆犬研究，科学

家使用激素诱导母犬发情，超数排卵以获取体内成熟的卵母细胞。同时，犬发情持续时间长，一只犬平均排卵7枚左右，排出的卵子处于GV期（GV期的卵母细胞没有恢复减数分裂，将颗粒细胞去掉之后可以看到明显的核），需要在输卵管内停留48~72小时到达减数第二次分裂中期，因而克隆胚与代孕母的生殖周期难以同步化等。这都成为犬体细胞克隆的瓶颈，使得犬体细胞克隆更是难上加难。

直到2005年，体细胞克隆犬才由韩国科学家黄禹锡成功制备。黄禹锡虽然因干细胞造假跌下学术神坛，但他在克隆犬方面的贡献却不能抹灭。他开发的克隆犬技术，让韩国在这个领域全球领先十几年。然而，这个垄断终于被中国人打破。希诺谷公司相继攻克了犬体细胞系建立、卵母细胞供体犬的发情鉴定、成熟卵母细胞的获取、体细胞核移植、胚胎融合激活及胚胎移植等技术难题，建立了具有自主知识产权的犬体细胞克隆技术平台。我国通过优化体细胞克隆



克隆犬“龙龙”



细胞核移植技术，是指将一个动物细胞的细胞核移植至去核的卵母细胞中，产生与供细胞核动物的遗传成分一样的动物的技术

技术平台，提高了犬克隆胚胎的着床效率。着床效率最高的一次是移植了7枚胚胎，有5枚胚胎成功着床，最终生了2只健康的克隆犬。而据韩国此前的报道，出生一只克隆犬，最少要移植12枚胚胎。此外，我国克隆犬目前的怀孕率在50%左右，也是高于韩国。

基因编辑克隆犬的意义

开发基因编辑克隆犬技术有什么用？根据考古学记载，自1.5万年前，犬就与人类结下不解之缘。犬是犬科动物中较早被驯化的，与人类关系亲近。犬也是非常理想和成熟的实验动物，犬与人类在营养代谢、生理解剖等方面有很多相似点，犬有900种遗传疾病，其中有400多种与人类遗传相似。而且狗温顺，易控制、易配合，是药筛的主要动物之一。

2005年12月8日美国科学家在《自然》杂志上宣布，研究人员成功破解犬的全部基因密码，并发现在1.93万个犬的基因中，至少有1.8万个与已经识别的人类基因相同，这表明人与犬不但有共同祖先，而且亲缘关系较近，犬中多数遗传疾病与人类遗传疾病相似。因此，体细胞核移植技术在犬上有以下几个方面应用前景：利用动物克

隆技术可以拯救濒危犬科动物。利用体细胞核移植技术生产转基因克隆犬，生产具有重要药用价值的活性物质。利用优良犬品种体细胞作核供体克隆优秀子代动物，可以避免自然条件下选种所受动物生殖周期和生育效率的限制，能大大缩短育种年限，提高育种效率。利用体细胞核移植技术，转入与肿瘤和癌发生有关基因，生产转基因动物，研究基因表达和调控规律，为癌症治疗提供依据。

传统的制备犬疾病模型的主要方法是饲喂法、机械损伤法及免疫学方法等，就是在健康动物的基础上，采用特殊的方法诱导使其出现疾病表型。而对犬基因组进行基因编辑，其疾病症状为原发症状，表型持续时间长，且具有可遗传性，通过自然繁殖即可获得子代疾病模型犬。

基因编辑克隆犬另一个应用领域，就是缉毒犬、搜救犬、军犬及导盲犬等均有特殊用途的工作犬市场。工作犬以前通过自然繁育，好的品种选育困难，需求大成本高。而通过基因改造，可以使狗肌肉棒棒的，嗅觉灵灵的，更聪明抗疲劳，扑咬能力较普通狗更胜一筹等。目前，韩国已经开辟了这一市场，韩国克隆犬的价格是10万美金一只。我们凭借稳定的技术体系，再加上商业推广，达到一定规模后，有望将成本降到一半。

基因定制的克隆有风险吗？

科学技术是一把“双刃剑”，在其为人类的生产和生活做出贡献的同时，本身也隐含着巨大的隐患。基因编辑又叠加了克隆技术，它可以为人们生命的延续带来强大的好处，也可能危及社会的安全甚至人类的生存，使社会为了抢夺有利的基因技术和基因编码展开战争。世界首例基因编辑克隆犬由中国人做出来，这项技术在治疗疾病、保护人类健康的同时，也引起了人们对社会伦理和道德的热烈讨论。

这样的克隆产品会不会带来风险？这是否损害动物福利？“定制+克隆”会“复制”到人吗？对克隆动物进行研究和探索，是对生命技术探索的一部分。基因编辑和克隆技术都存在科学和伦理的风险。在科研层面，如克隆动物会存在发育异常甚至过早死亡的情况，对于这些问题，人类尚未深刻透彻地了解，也远远不知道答案，这正是值得科研人员探讨和研究的。而在伦理特别是人胚胎

克隆方面，世界各国都有严格的法律规定。人胚胎克隆只能在体外培养，严禁植入子宫。人生殖克隆是全世界禁止的，在美国从事这类活动是要判刑的。人胚胎克隆技术只可以应用于治疗性克隆等基础研究，这在一些国家是允许的。

我国对实验动物有严格的管理办法和规范，并有专门的管理机构，对小动物基本没有伤害。

基因编辑遇上克隆，这是生命科学领域的一场新革命。对于这场科技革命，有人赞扬它强大的功能，也有人恐慌它可能带来的严重后果。不仅仅是科学家、政策的制定者和律师，越来越多的普通公众也参与到了这场激烈的讨论中来。这样的一门科学，使得人们对生物体的受孕、出生、身体构造甚至寿命等各方面具有更多的把控能力，但也带来了危险的可能性。究竟我们想要生活在一个什么样的世界里，要实现这一愿景应该制定什么样的政策，是时候该集体做出决定了。

(责编 桑新华)

基因编辑

一种叫作CRISPR/Cas9的基因编辑技术，像在文本文件中对文字的查找和替换功能一样，能对基因进行编辑

技术原理

