

# 小鼠胚泡注射 TCM-199 溶液的实验

王培生 李树英 魏钧

(中国科学院遗传研究所,北京)

哺乳动物中卵的显微操作技术是研究细胞分化、细胞器之间相互作用及基因调控的重要方法之一。卵显微注射是显微操作中一项较为困难的技术。1966年 Lin<sup>[2,3]</sup> 对小鼠原核期卵注射柠檬酸盐-洛克氏液, 1973年<sup>[4]</sup> 又对小鼠胚泡注射锥虫兰溶液, 均获得发育正常的小鼠。国内尚未见报道。

我们的试验主要是将 TCM-199 溶液注射于胚胎内, 观察对胚胎有无损伤作用, 并检验胚胎注射技术是否成功, 为今后开展这方面的研究创造条件。

## 材 料 和 方 法

**(一) 微管和卵穴的制备** 在哺乳动物卵显微注射中, 注射和固定卵所用的微管是采用拉针器拉制的, 即将外径约为 1mm 的玻璃毛细管拉成孔径大约 1—2 $\mu$ , 外径为 2—3 $\mu$ 。固定卵用的持卵微管则在微灯上用手工拉制, 孔径大约为 15 $\mu$ , 外径约为 70 $\mu$ 。

卵穴是显微注射时放卵用的, 采用 1.5mm 厚的凹孔玻璃片, 孔内放一小滴注射液, 注射液上覆盖石蜡油。

**(二) 卵和注射液的制备** 将黑色 C57BL、野灰色 C3H/Hemg 品系雄鼠分别与昆白品系雌鼠杂交。黑色、野灰色对于白色均为显性。在母鼠接受交配后的第 3 天, 用 2ml TCM-199 溶液分别冲洗两侧子宫角采集胚泡<sup>[4]</sup>。把形态正常的胚泡放在卵穴中央的注射液中, 以进行显微注射。

注射液: 每 100ml 含有 TCM-199 980mg, 丙酮酸钠 5.5mg, 碳酸氢钠 100mg, 乳酸钠

(70%) 0.48ml, 牛血清 20ml, 青霉素 7.5mg, 链霉素 5 mg, pH7.2。

**(三) 注射步骤** 将注射微管和持卵微管分别固定在显微操作器的两侧, 在解剖镜下将两支微管调整到一直线上。然后使微管首先接触到卵穴中石蜡油的顶部, 再使微管的尖端慢慢地进入石蜡油下的注射液中。利用持卵微管的负压将卵牢牢地吸住。注射微管的前端吸入注射液, 然后慢慢推进, 使微管尖穿过透明带和卵黄膜, 进入胚泡腔, 再将 1,400 $\mu^3$  (1 $\mu^3$  = 10<sup>-9</sup> $\mu$ l) TCM-199 溶液注入腔内(图 1)。

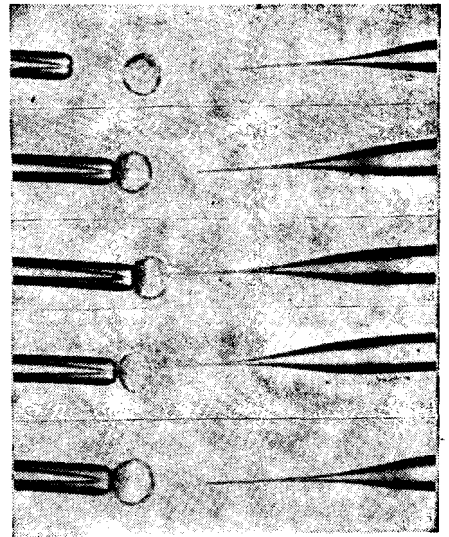


图 1 小鼠胚泡显微注射图示

1. 注射管顶部和持卵管保持在一条直线上;
2. 持卵管将卵吸牢;
3. 注射管穿过透明带;
4. 注射管穿过卵黄膜进入胚泡腔内;
5. 注射后将注射管撤回。

Wang Peisheng et al.: Development of Mouse Embryo after Injection of TCM-199 Fluid

表 1 小鼠胚泡注射和不注射移植的结果

实验组合	移植卵数(个)	受体数(只)	妊娠受体数(只)	发育胚胎数(只)	胚胎成活率(%)
对照组 <sup>1)</sup>	91	15	11	54	59.3
注射 1,400 $\mu^3$ TCM-199 液	110	23	13	44	40.0
只刺穿不注液	94	19	14	41	43.6

1) 卵不经过任何处理。

**(四) 胚泡注射后的移植** 为了观察注射溶液对胚胎发育的影响,注射后,将形态正常的胚泡移入假孕 2 天的昆白雌鼠子宫内<sup>1)</sup>。部分雌鼠在妊娠的第 17 天剖检,其余待仔鼠出生后检查。由于杂种胎儿眼睛均含有色素,因此移植胚泡的发育可通过胎儿眼睛的色素来鉴别。

## 结果与讨论

1. 注射了 110 个杂种胚泡,每个胚泡大约注射 1,400 $\mu^3$  TCM-199 溶液,移入 23 只昆白品系雌鼠子宫内。有 13 只受体妊娠,其中 7 只解剖后得到 14 只活胎儿,6 只产出幼鼠 30 只,均为发育正常的有色杂种。胚胎成活率为 40.0% (表 1)。

2. 小鼠胚泡显微注射后大约有 15—20% 胚泡发生破裂。受注射的卵和只刺穿而不注入溶液的卵的成活率并无显著差异,这说明,主要是刺穿而不是注入溶液影响了部分卵的正常发育。未经任何处理的卵的成活率则较高。

3. 在小鼠胚泡显微注射中,微管的制作是关键。由于卵的透明带较厚,而且卵黄膜有较大的弹性,因此注射微管的顶部一定要短硬而锐利,否则刺穿卵黄膜是困难的,而且很容易造成胚泡破裂。持卵微管顶端要比小鼠卵直径稍小一点,孔径不可太小,否则就不能将卵吸牢。如果管顶端不光滑或吸入过份时,卵就容易被损坏。其次是,当微管尖刺入胚泡腔或由腔内撤回时也是显微注射成败的重要环节。因此,须缓缓地刺入和撤回,否则很容易引起胚泡的破裂。

## 参 考 文 献

- [1] 王培生、杨秀琴、荣瑞章: 1980. 遗传, 2 (5): 42—43.
- [2] Lin, T. P.: 1966. *Science*, 151: 333—337.
- [3] —: in *Methods in Mammalian Embryology*, (ed. by J. C. Daniel) pp. 157—171.
- [4] — and I. W. Monie: 1973. *J. Reprod. Fert.*, 32: 149—151.