

转基因小鼠技术中获得原核期受精卵最适时间的研究

何学令, 尹海林*

(四川大学实验动物中心, 成都 610041)

摘要: 显微注射法是制备转基因动物的首选方法, 而原核清晰受精卵的获得是影响显微注射成败的关键。本文对小鼠 HCG 超排注射后大量原核期受精卵获得的最佳时间进行了研究, 以提高显微注射成功率。结果显示采集雄性原核清晰受精卵的最佳时间段为注射 HCG 后 25~27h。

关键词: 转基因小鼠; 受精卵; 原核

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083 (2004) 04-0341-03

Optimal Time to Collect Fertilized Egg with Clear Pronuclei for Making Transgenic Mouse

HE Xue-ling, YIN Hai-lin

(Laboratory Animal Center of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041)

Abstract: Microinjection is the most efficient method to produce transgenic animal today. To obtain the fertilized eggs with clear male pronuclei is the key of success. This article figures out the optimal duration in obtaining the suitably fertilized eggs with clear male pronuclei of mouse after HCG (human chorionic gonadotropin) injection. The result showed that the optimal duration of obtaining the suitably fertilized eggs with clear male pronuclei of mouse was 25-27h after HCG injection.

Key words: transgenic mouse; fertilized egg; pronuclei

制作转基因动物是将外源基因导入整合到受体动物基因组并表达的一项遗传改造技术, 广泛用于生物医学研究、制药、农牧业等领域。在诸多制作转基因动物的方法中, 通过将外源基因注射到原核期受精卵雄性原核中并整合到小鼠基因组中的受精卵原核显微注射法是发展最早, 也是最有效方法, 是迄今国际公认的制备转基因动物的首选方法, 仍为绝大多数实验室采用^[1,2]。该方法涉及的环节多, 影响成功率的因素也较多, 其中得到原核大而清晰的原核期受精卵是影响显微注射成败的关键。本文对小鼠 HCG 超排注射后大量原核期受精卵获得的最佳时间进行了研究, 旨在为进一步提高显微注射成功率打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 孕马血清促性腺激素 (PMSG): 1000 IU/支, 白色冻干粉末, 杭州日月动物药品

有限公司生产, 批号: 031016; 人绒毛膜促性腺激素 (HCG): 1000 IU/支, 白色冻干粉末, 杭州日月动物药品有限公司生产, 批号: 030925; 透明质酸酶: 终浓度 300 U/ml, Sigma 公司产品; M2 培养液, 实验室自行配制, 培养液配方见文献 [3]。

1.1.2 仪器设备 体视解剖镜、倒置显微镜、培养皿 (BIOFIL 公司产品)、移卵针 (自制): 内径 120~140 μ m,

1.1.3 实验动物 昆明种小鼠 (雌性), 7 周龄, 体重 20 \pm 2g。由本实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 小鼠的超排 雌鼠于第 1 日 15:00 腹腔注射 PMSG 10 IU, 46h 后 (第 3 日) 再注射 HCG 10 IU, 然后与正常公鼠 1:1 合笼, 第 4 日清晨检查雌鼠是否有阴栓。有阴栓者作受精卵细胞的供体鼠。

1.2.2 受精卵的采集 分别在注射 HCG 后 17、

18、19、20、21、24、25、26、27、28h 时间段取卵。断颈法处死供体鼠，使其四肢伸开平展，75% 酒精消毒腹部后，打开腹腔，于背侧肾下方找到脂肪包裹的卵巢。用镊子轻轻提起输卵管，仔细分离去除输卵管周围的脂肪和结缔组织后，用镊子夹住子宫与输卵管的连接处，先剪断卵巢与输卵管连接，再剪断子宫与输卵管连接，即得到输卵管部分。迅速将输卵管放在经 37℃ 预热的 M2 培养液中，在解剖镜下用镊子和移卵针小心撕开其透明膨大的壶腹部，即可看到含受精卵的丘细胞团释放出来，稍加挤压撕开部位的两侧，待释放完全后，将含受精卵的丘细胞团小心移到含透明质酸酶的 M2 培养液中，镜下观察待受精卵颗粒上脱落后，立刻

用移卵针移出受精卵，在 M2 培养液中洗 3~4 遍。洗涤后的受精卵放在倒显微镜下观察原核的发育情况。

2 结果

结果发现，在注射 HCG 后 18~27h 时间段，受精卵原核出现的数量随时间间隔增长而增加。其中，在注射 HCG 后 25~27h 原核出现最多，受精卵原核大而清晰，适合显微注射。在 27h 后原核期受精卵的数量随着时间间隔的增长而减少。在注射 HCG 后 28h，受精卵原核出现的百分率明显低于注射 HCG 后 25~27h 时间段（见表 1、图 1、2，图 2 在封 3）。

表 1 随时间变化受精卵原核出现的百分率 (%)

动物数量 (只)	取卵时间 (h)	正常受精卵总数 (个)	原核受精卵数 (个)	原核数百分率 (%)
8	18	236	29	12.3
10	19	272	96	35.3
12	20	325	169	52.0
10	21	337	217	64.4
18	24	553	418	75.6
20	25	591	486	82.2
20	26	602	519	86.2
12	27	371	328	88.4
10	28	297	222	74.7

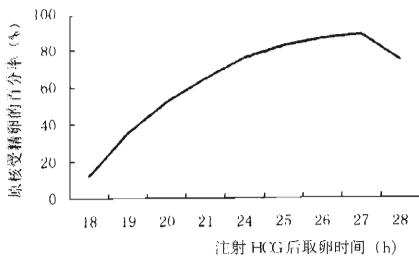


图 1 原核受精卵数与注射 HCG 后时间的关系

3 讨论

获得清晰的原核可避免显微注射时对核仁的损伤，是显微注射成败的关键因素之一。受精卵发育的整齐度与鼠房光周期和注射 PMSG 和 HCG 的间隔时间有很重要的关系。因此，为同时获得发育时相均匀的原核期受精卵，本实验注射 PMSG 和 HCG 的间隔时间是 46~48h^[4]，即 PMSG 在第 1 日 15:00 注射，HCG 在第 3 日 1:00 注射。同时光周期控制为：光亮期是 7:00~19:00，黑暗期是 19:00~7:00，获得了良好的结果。

在以往也有类似的报道，但就最佳受精卵原核

出现时间的研究并不详细。李子义等^[5]只在注射 HCG 后 16~20h 进行了研究，所得到的受精卵原核百分率最高只有 67.5%。张得福^[2]等和王英等^[6]只报道了一个大体的时间，对受精卵原核出现的百分率的时间分布未作报道。本研究在前人的基础上就最佳受精卵原核出现时间进行了详细的研究，结果表明为提高显微注射成功率，采集雄性原核清晰受精卵的最佳时间段为注射 HCG 后 25~27h，适合显微注射的原核期受精卵百分率达到了 80% 以上。

4 参考文献

[1] 谢卫兵, 陈汉源, 曾位森. 应用显微注射法建立转基因小鼠 [J]. 解剖科学进展, 1998, 4 (2): 89~191.
 [2] 张德福, 陈茵, 王英, 等. 影响小鼠转基因原核胚体外发育的若干因素 [J]. 中国兽医学报, 2001, 1 (3): 55~257.
 [3] Hogan B, R Beddington, F Costantini, et al. Manipulation the Mouse Embryo, A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press,

- 1994: 130~135.
- [4] 陈永福. 转基因动物[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 35~38.
- [5] 李子义, 谭景和, 孙兴参, 等. 昆明小鼠早期胚胎发育时程[J]. 中国兽医学报, 1999, 19 (6): 597~601.
- [6] 王英, 张德福, 刘丽君, 等. 影响小鼠显微注射胚胎质量的若干因素[J]. 动物科学与动物医学, 2000, 17 (3): 25~26.

欢迎订阅 2005 年 (第 24 卷) 《四川动物》杂志

《四川动物》杂志由四川省动物学会、四川省野生动物保护协会、四川大学生命科学学院主办, 创刊于 1981 年, 系国内外公开发行的动物学综合性学术刊物, 为中国科技论文统计源期刊, 中国学术期刊 (光盘版)、中国期刊网、中国数字化期刊群 (万方)、中国学术期刊综合评价数据库、中文科技期刊数据库和中国生物学文摘等收录, 2004 年入编《中文核心期刊要目总览》第四版。本刊以普及与提高相结合、基础性与应用性并重为宗旨, 主要报道和交流动物学及其分支学科, 生物多样性、保护生物学和野生动物保护方面的基础研究、应用基础研究的成果、理论、经验和动态, 宣传保护野生动物。

读者对象: 动物学、生物学和野生动物保护等的科研、教学、医卫、管理等科技工作者、有关院校师生和广大业余爱好者。

订阅办法: 本刊自办发行, 季刊, 大 16 开, 每期 80 页, 精印彩色封面, 季中月末出版, 2005 年第 24 卷全年 4 期, 国内定价 50.00 元, 不另收邮费。散刊含邮费每本 15.00 元。从邮局汇款至本刊编辑部 (四川省成都市望江路 29 号四川大学生命科学学院内本刊编辑部, 邮政编码: 610064), 写清订阅人姓名、地址、邮编即可订阅。

何学令，尹海林：转基因小鼠
技术中获得原核期受精卵最适
时间的研究（图）

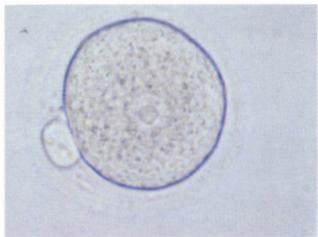


图2.小鼠原核期受精卵