

离子浓度对小鼠 2-细胞胚胎电融合的影响

邸科前, 李相运*

(河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071001)

摘要: 四倍体胚胎的制备已经成为生物学家研究小鼠以及其它哺乳动物发育生物学的有力工具。目前, 制备小鼠四倍体胚胎最常用的方法是电融合法, 其中电融合液中的离子种类和离子浓度是影响胚胎电融合成败的关键因素。本文比较了 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 等阳离子对小鼠 2-细胞胚胎电融合的影响。结果发现, 在 100 V/mm 电场强度、50 μsec 脉冲时程和 2 次脉冲的电融合条件下, 少量二价阳离子的存在是胚胎融合所必须的, 当 Ca^{2+} 为 0.1 mM 时, 可使全部胚胎发生电融合, 而一价阳离子的存在不利于胚胎的电融合。随着各种离子浓度的大幅升高, 胚胎的融合率急剧下降、胚胎死亡数量增加以及死亡程度加剧。

关键词: 小鼠; 2-细胞胚胎; 阳离子; 电融合

中图分类号: Q813 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083(2006)01-0051-04

Effects of Cation on Mouse 2-cell Embryos Electrofusion

DI Ke-qian, LI Xiang-yun

(College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: The production of tetraploid embryos has become a useful tool for mouse developmental biologists within the past decade and is increasingly being used in other mammalian systems. Most notably, tetraploid embryos are commonly used to rescue embryonic lethality as a result of defective extraembryonic phenotypes in laboratory mouse strains, as well as a method of generating mice directly from embryonic stem cells. Currently, the most commonly used method of producing mouse tetraploid embryos is electrofusion by electrical stimulation. Several factors influence the efficiency of the electrofusion. In addition to the alignment of the embryos with respect to the electric field and electric field strength, the other key factor is the concentration of cation in pulsing medium. The efficiency of 6 kinds of cation on mouse 2-cell embryo electrofusion were studied in the present paper, two square DC pulses of 100V/mm and duration of 50 μsec were applied when electrical stimulation. The results showed that divalent cations were necessary to achieve embryo electrofusion, and univa-

收稿日期: 2005-03-06 基金项目: 河北农业大学校长基金资助, 国家自然科学基金项目 (30571336)

* 通信作者, 博士, 从事胚胎与胚胎干细胞研究工作, E-mail: lixiangyun35@yahoo.com.cn

- Mgmt, 1980, 50: 325~330.
- [23] Shrestha MN. Animal welfare in the musk deer [J]. Appl Anim Behav Sci, 1998, 59: 245~250
- [24] Kilgour R, Skarscholt BH, Smith JF, Bremner KJ, Morrison MCL. Observation of the behaviour and factors influencing the sexually active group in cattle [J]. Proc N Z Soc Anim Prod, 1977, 37: 128~135
- [25] Humnik JF, King GI. Oestrous behaviour in confined beef cows [J]. J Anim Sci, 1987, 65: 431~438.
- [26] Mohammed HO, White ME, Guard CI, Smith MC, Mechor GD, Booker CW, Warnick LD, Dascanio JJ, Kenny DJ. A case control study of the association between blood selenium and cystic ovaries in lactating dairy cattle [J]. Prev Vet Med, 1991, 10: 261~271.
- [27] Medrano EA, Hernandez O, Lamonthe C, Galina CS. Evidence of asynchrony in the onset of signs of estrus in Zebu cattle treated with a progestagen ear implant [J]. Res Vet Sci, 1995, 60: 51~54.
- [28] Lamonthe C, Montiel F, Fredrikson G, Galina CS. Reproductive performance of Zebu cattle in Mexico. 3. Influence of season and social interaction on the timing of expressed oestrus [J]. J Trop Agric, 1995, 72: 1~5.
- [29] Castellanos FA, Orihuela A, Galina CS. Oestrous expression in dairy cows and heifers (*Bos taurus*) following repeated PGF $_{2\alpha}$ injection and choice of selecting a mounting partner [J]. Appl Anim Behav Sci, 1997, 51: 29~37.
- [30] Clutton-Brock TH, Albow SD and Guinness FE. Fitness costs of gestation and lactation in wild animals [J]. Nature, 1989, 337: 260~262.
- [31] Clutton-Brock TH, Stevenson TR, Marrow P, MacColl AD, Houston AI and McNamara JM. Population fluctuation, reproductive costs and life-history tactics in female soay sheep [J]. J Anim Ecol, 1996, 65: 675~689.
- [32] Guinness FE, Gibson RM and Clutton-Brock TH. Calving times in red deer (*Cervus claphus*) on Rhum [J]. J Zool (Lond.), 1978, 185: 105~114.
- [33] Mitchell B, Mccowan D and Nicholson IA. Annual cycles of body weight and condition in Scottish red deer, *Cervus elaphus* [J]. J Zool (Lond.), 1976, 180: 107~120.

lent cations were an inhibitor affecting the embryo electrofusion. The decreased electrofusion rate and the increased death rate of 2-cell embryos were observed when the concentration of each cation was evidently raised.

Key words: mouse; 2-cell embryo; cation; electrofusion

哺乳动物四倍体胚胎的自然发生率很底,它是一种染色体畸形,不能正常发育,小鼠四倍体胚胎可以着床,部分可以发育到原肠形成后期,但不能发育到妊娠期末,形成正常胎儿(Kaufman & Webb, 1990; Eakin & Behringer, 2003)。在小鼠四倍体胚胎与二倍体胚胎或者胚胎干细胞(ES)的嵌合体中,四倍体胚胎成分主要参与胎儿胚外组织而几乎不参与胚体的形成(Eakin & Behringer, 2003; Nagy *et al*, 1990, 1993; Eggan *et al*, 2001, 2002)。在过去 20 年里,四倍体胚胎的制备已经成为生物学家研究小鼠以及其它哺乳动物发育生物学的有力工具。例如,用它来研究早期胎儿发育过程中调节细胞体积、细胞数目以及细胞分裂速率的机制,也可用它来改变双亲基因组在子代中的分配比例,但最重要的用途是:利用四倍体胚胎挽救胚外组织的发育缺陷,以及通过四倍体胚胎补偿法制备完全由 ES 细胞发育而来的小鼠(Nagy *et al*, 1990, 1993; Eggan *et al*, 2001, 2002),为研究人类基因功能和构建疾病动物模型提供了一条有效途径。目前,制备小鼠四倍体胚胎最常用的方法是电融合法。这种方法简便而高效,具有很好的重复性和可操作性,且融合后的胚胎能在体外继续发育。在小鼠 2-细胞胚胎的电融合过程中,除胚胎在电场中的排列方式以及电场强度外,电融合液的组成也是影响 2-细胞胚胎融合的关键因素。本文比较了 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 等阳离子对小鼠 2-细胞胚胎电融合的影响。

1 材料与方法

1.1 2-细胞胚胎的获取

出生 4~5 周龄 CD-1 雌鼠(由北京大学实验动物部提供,光照周期 12L:12D,每日 7:00~19:00 光照。)于下午 14:00 腹腔注射 PMSG 10UI(天津市激素制品厂);48 h 后,腹腔注射 hCG 10UI。以 1:1 的比例与 CD-1 公鼠合笼。次日清晨检查阴道栓,以出现阴道栓为受精的第 1d。在受精后第 2d 12:00,打开见栓母鼠腹腔,暴露子宫,将卵巢和输卵管一并剪下,置无菌培养皿中。将注射器从输卵管伞部插入输卵管,冲洗输卵管并收集

2-细胞胚胎。在实体显微镜下剔除未受精的卵母细胞和变性胚,挑选正常的 2-细胞胚胎置 M2 (Nagy *et al*, 2003) 操作液中。

1.2 电融合液的配制

用超纯水(Milli Q)配制 0.3 M 甘露醇(Sigma)溶液 100 ml,再加 100 mg BSA(Sigma),过滤除菌,分装, -20°C 保存。配制 6 种化合物即 CaCl_2 、 MgCl_2 、 SrCl_2 、 NaCl 、 KCl 和 LiCl (Sigma)的浓贮液($100\times$),融合前,根据需要添加不同浓度的离子。

1.3 2-细胞胚胎的电融合及培养

将 2-细胞胚胎用融合液洗涤 3 次后移入 3.2 mm 电融合槽两电极间(ECM2001, BTX, San Diego, CA)。先施加 7 V/mm 交流电压,待所有胚胎两分裂球的接触面与电场方向垂直时,开始电融合(320V, $50\mu\text{sec}$, 脉冲 2 次)。处理后的胚胎用 M2 液洗涤两次后移入 KSOM 液(Nagy *et al*, 2003)中培养,1h 后观察,弃去未融合的和死亡的胚胎,融合胚胎置 37°C 、5% CO_2 培养箱中过夜培养。

1.4 数据统计处理

融合后 1h,计算融合胚胎和死亡胚胎所占 2-细胞胚胎的比例以及融合胚胎过夜培养后发育到 4-细胞胚胎的比例,并用 t 测验进行样本百分数的两两比较。

2 结果

在 3 种浓度梯度下(0.1 mM、1 mM、10 mM),6 种阳离子对小鼠 2-细胞胚胎电融合的作用见表 1,当不添加任何离子时,胚胎的融合率只有 22.2%,当添加 0.1 mM 的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 或 Sr^{2+} 离子时,融合率大幅度提高($P<0.01$),其中以添加 0.1 mM Ca^{2+} 离子的作用最为明显,融合率可达 100%,当 Ca^{2+} 离子浓度为 1 mM 时,融合率只有 25.0%且出现 25.0%的胚胎死亡率,当 Ca^{2+} 离子浓度为 10 mM 时,胚胎全部死亡。同样,当 Mg^{2+} 和 Sr^{2+} 离子的浓度从 0.1 mM 升高到 10 mM 时,融合率下降且导致胚胎大部分死亡,就这 3 种二价阳离子来说,似乎 Ca^{2+} 离子对融合率的作用

较为敏感。相反,当添加 0.1 mM 的 Na^+ 、 K^+ 或 Li^+ 离子时,融合率不但没有提高反倒下降 ($P < 0.01$),当这 3 种一价阳离子的浓度升高到 1 mM 和 10 mM 时,胚胎几乎不发生融合,而且出现大部分死亡。这些结果说明:低浓度的二价阳离子对

胚胎的融合有促进作用,而一价阳离子则不利于胚胎的融合,当所有离子的浓度大幅度提高时,都不利于胚胎的融合。此外,从表 1 还可发现:不管添加何种离子都不影响融合胚胎的发育能力,大部分融合胚胎过夜培养后都可发育到 4-细胞阶段。

表 1 不同阳离子浓度对小鼠 2-细胞胚胎电融合的影响
Table 1 Effects of six kinds of cation on mouse 2-cell embryo electrofusion

融合液	2-细胞胚胎数	融合胚胎数 (%2-细胞胚胎)	融合后的死亡胚胎数 (%2-细胞胚胎)	融合胚胎发育至 4-细胞胚胎数 (%融合胚胎)
PM	126	28 (22.2)	0 (0)	22 (78.6)
PM *	98	81 (82.7)	0 (0)	64 (79.0)
PM + 0.1mM CaCl_2	124	124 (100)	0 (0)	111 (89.5)
PM + 1mM CaCl_2	140	35 (25.0)	35 (25.0)	28 (80.0)
PM + 10mM CaCl_2	133	0 (0)	133 (100)	0 (0)
PM + 0.1mM MgCl_2	91	79 (86.8)	0 (0)	67 (84.8)
PM + 1mM MgCl_2	105	77 (73.3)	0 (0)	72 (93.5)
PM + 10mM MgCl_2	121	0 (0)	106 (87.6)	0 (0)
PM + 0.1mM SrCl_2	94	76 (80.9)	0 (0)	65 (85.5)
PM + 1mM SrCl_2	96	79 (82.3)	0 (0)	63 (79.7)
PM + 10mM SrCl_2	87	0 (0)	72 (82.8)	0 (0)
PM + 0.1mM NaCl	116	4 (3.4)	0 (0)	2 (50.0)
PM + 1mM NaCl	113	0 (0)	80 (70.8)	0 (0)
PM + 10mM NaCl	124	0 (0)	83 (66.9)	0 (0)
PM + 0.1mM KCl	128	6 (4.7)	0 (0)	3 (50.0)
PM + 1mM KCl	103	0 (0)	75 (72.8)	0 (0)
PM + 10mM KCl	117	0 (0)	80 (68.4)	0 (0)
PM + 0.1mM LiCl	110	10 (9.1)	0 (0)	8 (80.0)
PM + 1mM LiCl	100	5 (5.0)	60 (60.0)	4 (80.0)
PM + 10mM LiCl	125	0 (0)	125 (100)	0 (0)

PM: 0.3M 甘露醇 + 0.1% BSA; *: 配制 PM 液的水为市售矿泉水。

3 讨论

融合液中微量的阳离子浓度会显著影响 2-细胞胚胎的融合率。所以在配制融合液时,水的质量一定要保持稳定,要始终用同一来源的水,不能频繁更换水,如有时用 Milli-Q 水、有时用四蒸水、有时用去离子水,不同地区以及经过不同处理的水中的阳离子种类和浓度肯定有差异。有报道说 PM 液中不添加任何离子都可获得 90% 以上的胚胎融合率 (Nagy *et al*, 1993, 2003; Joyner, 1993)。作者在以前的同类实验中也发现过这种现象,之所以造成这种显著的差异,很可能就是由于配制融合液所用的水不同。如果用市售的矿泉水配制融合

液,即使不添加任何离子,也能获得很好的胚胎融合率 (82.7%) 和融合胚胎发育能力。2-细胞胚胎的电融合需要微量的二价阳离子的参与 (Nickoloff, 1995), Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 或 Sr^{2+} 都可以,但以 Ca^{2+} 的作用最为显著, Mg^{2+} 和 Sr^{2+} 次之,一价阳离子 (Na^+ 、 K^+ 、 Li^+) 不利于胚胎的融合,不同离子对融合胚胎的体外发育能力没有产生不良影响,所有实验组的融合胚胎经过夜培养后大部分都可顺利发育至 4-细胞阶段。本实验没有研究这 6 种离子的不同组合方式对胚胎电融合的影响。目前还不清楚这些离子是通过什么样的机制来影响胚胎细胞的融合过程。

除融合率外, 胚胎经含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 或 Li^+ 离子的融合液作用后的融合速度也不一样。实验发现: Ca^{2+} 组胚胎融合的速度最快, 其他离子组较慢, Ca^{2+} 组的胚胎在电融合实施后 20 min 就已经完成融合过程, 融合胚胎呈圆形, 看不到胚胎的两个分裂球, 只能看到两个细胞核, 而此时, 其他离子组的大部分胚胎还正在融合, 胚胎呈“8”字形, 这些胚胎完成融合过程约需要 40 min。此外, 关于胚胎的死亡现象, 在 1 mM 离子浓度的 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 和 Li^+ 组中, 死亡的胚胎大部分只有一个分裂球碎裂, 而在 10 mM 离子浓度的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 和 Li^+ 组中, 几乎所有的死亡胚胎都是两个分裂球同时碎裂。

融合液的电导率对胚胎分裂球的紧密聚集和电融合有重要影响。一般要求融合液的电导率小于 $300\mu\text{S}/\text{cm}$, 当电导率增大, 电融合时融合液的温度会急剧升高, 这将对胚胎成活率造成严重影响。在稀溶液中, 融合液的电导率等于各种离子电导率之和, 因此, 为了能正常进行胚胎电融合, 必须大大降低融合液的离子浓度。在本实验的 6 种离子中, Na^+ 和 K^+ 的电导率最高, Sr^{2+} 最低, 即使融合液中包含少量的 Na^+ 或 K^+ , 也可使胚胎不能融合 (0.1 mM), 甚至导致大部分胚胎死亡 (1 mM)。总体来说, 随着各种离子浓度的大幅升高, 胚胎融合率急剧下降、胚胎死亡数量增加、死亡程度加剧, 这都是因融合液电导率升高导致的结果。但是已有实验和本实验证明, 细胞电融合必须要有少量二价阳离子的存在, 但它们对促进细胞电融合的机制和适宜的浓度尚无定论 (Nickoloff, 1995),

多数实验认为 Ca^{2+} 达到 0.1 mM, Mg^{2+} 达到 0.5 mM 时, 对稳定细胞膜来说已足够, 对增进融合率来说也已接近最大值。

3 参考文献

- [1] Kaufman MH, Webb S. Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion [J]. *Development*, 1990, 110: 1121~1132.
- [2] Eakin GS, Behringer RR. Tetraploid development in the mouse [J]. *Developmental Dynamics*, 2003, 228: 751~766.
- [3] Nagy A, Gocza E, Diaz EM, Prideaux V, Ivanyi E, Markkula M, Rossant J. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse [J]. *Development*, 1990, 110: 815~821.
- [4] Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 8424~8428.
- [5] Eggan K, Rode A, Jentsch I, Samuel C, Hennek T, Tintrup H, Zevnik B, Erwin J, Loring J, Jackson-Grusby L, Speicher MR, Kuehn R, Jaenisch R. Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 455~459.
- [6] Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout 3rd WM, Yanagimachi R, Jaenisch R. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 6209~6214.
- [7] Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* [M]. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2003: 359~398.
- [8] Joyner A. *Gene Targeting: A Practical Approach* [M]. Oxford: IRL Press, 1993: 147.
- [9] Nickoloff JA. *Animal Cell Electroporation and Electrofusion Protocols* [M]. New Jersey: Humana Press Inc, 1995: 283.