

移植方法和培养液对显微注射 生产转基因小鼠的影响*

史洪才¹, 玛依拉¹, 黄俊成¹, 刘明军¹, 李建华², 郭志勤¹

(1 新疆畜牧科学院 农业部畜牧兽医生物技术重点开放实验室, 新疆 乌鲁木齐 830000;

2 甘肃农业大学 动物科技学院, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 研究了移植方法和培养液对显微注射法生产转基因小鼠的影响。结果表明, 小鼠受精卵显微注射外源基因后, 进行单、双侧输卵管移植, 受体的妊娠率分别为 34.4% 和 37.5% ($P > 0.05$), 差异不显著; 但仔鼠成活率分别为 83.6% 和 97.2% ($P < 0.05$), 差异显著。用 M2 和改良的 M2 培养液作为显微注射及移植工作液, 体外培养的囊胚率分别为 17% 和 35% ($P < 0.01$), 差异极显著, 体内发育的情况也与这一结果相似, 妊娠率分别为 35.9% 和 62.5% ($P < 0.05$)。表明改良的 M2 培养液的成分结构更适合小鼠胚胎发育的要求。

[关键词] 显微注射; 转基因小鼠; 受精卵移植

[中图分类号] Q 786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)02-0006-03

1982 年, 美国学者 Palmiter 通过原核注射的方法将大鼠金属硫蛋白和人生长激素的融合基因导入小鼠受精卵, 获得了“超级小鼠”(supermouse)^[1]。“超级小鼠”的建立引起了很大的轰动, 许多实验室竞相开展这方面的研究工作。由于转基因小鼠的建立比其他大型转基因哺乳动物的建立要省时、省力, 因此, 转基因小鼠作为生命科学研究的一个新体系已经得到越来越广泛的应用。特别是转基因小鼠对于真核生物(主要是哺乳动物)基因表达调控机理的研究, 以及外源基因在大家畜整合表达的预测等方面的研究发挥着尤为重要的作用。转基因小鼠作为人类疾病的动物模型, 对揭示疾病的发病机理及探索治疗方法, 尤其对遗传疾病、恶性肿瘤等方面的研究具有十分重要的意义。因此, 转基因小鼠技术近年来发展迅速, 并不断完善。在生产转基因小鼠的过程中, 受体的成功妊娠及产仔是非常关键的。优化各种不同因素对受体的成功妊娠及产仔具有重要作用。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验鼠为农业部畜牧兽医生物技术重点开放实验室提供的清洁级小鼠。小鼠饲养室进行光照控制, 每天照明与黑暗时间均为 12 h。供卵鼠为昆明白小鼠与 NIH 小鼠杂交产生的 F₁ 代杂交鼠, 7~8 周龄, 体重 22 g 左右。受体鼠为经产一胎的昆明白母鼠。

昆明白公鼠为手术烧断输精管得到结扎公鼠。手术 2 周后进行配种试验。

1.2 供卵鼠的处理及受精卵采集

供卵鼠第 1 天 13:00 (以下均为北京时间) 腹腔注射 PM SG (孕马血清促性腺激素) 10 IU (天津动物中心产, 批号 9204), 46~48 h 时注射 HCG (人绒毛膜促性腺激素) 10 IU (宁波激素制品厂, 批号 970106), 注射后按公母数 1:1 放入公鼠笼交配。交配后第 2 天上午 10:00 检查有无阴道栓, 将有阴道栓的供体小鼠采用断颈法处死, 从输卵管膨大部收集受精卵及卵丘细胞复合物, 置于含 230 IU/mL 透明脂酸酶的培养液中消化 5 min, 挑出受精卵待用。

1.3 受体鼠的准备

在供卵鼠注射 HCG 的同时, 受体鼠按 1:1 放入结扎公鼠笼, 第 2 天检查是否有阴道栓, 将有阴道栓的受体鼠作为移植受体。

1.4 受精卵的显微注射及移植

挑选有原核的受精卵进行显微注射, 注射外源基因的卵在 CO₂ 培养箱中培养 20~30 min。将存活的卵在体视镜下进行移植。观察受体的卵巢是否有排卵点, 如有排卵点即进行移植, 平均 25~30 枚卵移植 1 只受体, 将卵移入输卵管口内。在输卵管膨大部内可见小气泡, 说明卵移入了输卵管^[2]。

* [收稿日期] 2002-05-20

[基金项目] 国家 863 资助项目 (Z21-03-03)

[作者简介] 史洪才(1969-), 男, 助理研究员, 在读硕士, 主要从事家畜转基因和胚胎工程技术研究。

1.5 M2 和改良的M2 培养液

M2 培养液配方见文献[3], 改良的M2 培养液是在M2 培养液基础上除去葡萄糖和磷酸盐, 添加了 0.127 mmol/L EDTA, 2 mmol/L 牛磺酸, 2 mmol/L 谷胺酰胺, 5.55 mmol/L 果糖^[4]。从收集受精卵到最后移植全部使用M2 或改良的M2 作为培养液^[5]。

1.6 统计处理

采用 χ^2 (卡方) 检验进行统计分析。

2 结 果

2.1 显微注射对胚胎发育的影响

注射过基因的小鼠 1-细胞胚胎与未注射基因的小鼠 1-细胞胚胎体外培养结果见表 1。

2.2 单、双侧输卵管移植试验

在进行双侧输卵管移植时, 两侧分别进行手术。单、双侧输卵管移植妊娠、产仔结果见表 2。

表 1 显微注射对胚胎发育的影响

Table 1 Effect of microinjection on embryo development				
处理 Treatment	培养胚胎数 No. of embryos	2~8 细胞/% No. of 2~8 cells	桑葚胚率/% Morula rate	囊胚率/% Blastocysts rate
注射 Injected	125	86a (107/125)	43.9a (55/125)	30.1a (37/125)
未注射 Uninjected	134	85a (114/134)	42.5a (57/134)	44.2a (52/134)

注: 同列标相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 下表同。

Note: Within same column, same lowercase letter shows no significant difference ($P > 0.05$). The following tables are the same

表 2 单、双侧输卵管移植妊娠和产仔结果

Table 2 Result of pregnancy and produced pups by transplanting to one oviduct or two oviducts						
处理 Treatment	受体数 No. of recipients	妊娠受体数 No. of pregnancy	妊娠率/% Pregnant rate	仔鼠总数 No. of new born mice	成活仔鼠数 No. of surviving mice	仔鼠成活率/% Pup surviving rate
单侧移植 Transplanting to one oviduct	32	11	34.4a	55	46	83.6a
双侧移植 Transplanting to two oviducts	32	13	37.5a	76	74	97.2b

2.3 用M2 和改良的M2 培养液作为显微注射及移植工作液的试验

用M2 和改良的M2 培养液作为体外培养显微注射受精卵的工作液结果见表 3, 其妊娠、产仔的结果见表 4。

表 3 用M2 和改良的M2 培养液体外培养显微注射受精卵的结果

Table 3 Result of microinjected zygotes with M2 media and Modified M2 media in vitro culture

培养液 Media	2~8 细胞 2~8 cell	桑葚胚率/% Morula rate	囊胚率/% Blastocysts rate
M2	84	19a (16/84)	17c (14/84)
改良的 M2 Modified M2 Media	107	51b (55/107)	35d (37/107)

表 4 用M2 和改良的M2 培养液为显微注射及移植工作液妊娠、产仔结果

Table 4 Result of pregnancy and produced pups by using M2 media and Modified M2 media as microinjected and transferring work solution

培养液 Media	受体数 No. of recipients	妊娠受体数 No. of pregnant mice	妊娠率/% Pregnant rate
M2	64	23	35.9a
改良的 M2 Modified M2 media	24	15	62.5b

3 分析与讨论

在进行转基因小鼠生产时, 许多因素影响受体的妊娠。例如, 基因注入的方法和注射量直接影响受精卵的发育, 从而影响受体的妊娠。同时, 受体的状况, 如体况、年龄、是否经产、发情状况等, 饲养室的环境, 如温度、湿度、光照等, 以及移植技术是否熟练等都直接影响到受体的妊娠。

表 1、表 2 说明, 小鼠受精卵注射了外源基因后, 胚胎在体外发育受到了一些影响, 但差异不显著。在本试验中, 小鼠的受精卵显微注射同种外源基因, 平均 25~30 枚注射的受精卵移植 1 只受体。结果表明, 单、双侧输卵管移植的妊娠率差异不显著, 分别为 34.4% 和 37.5% ($P > 0.05$), 但仔鼠成活率差异显著, 分别为 83.6% 和 97.2% ($P < 0.05$)。单、双侧输卵管移植的妊娠效果差异不显著, 是因为在进行双侧移植时, 手术时间较长, 有时受体出血较单侧移植多, 对受体的术后身体恢复影响较大, 从而致使妊娠率下降。单、双侧输卵管移植的仔鼠成活效果表现差异显著。其中, 单侧输卵管移植的受体中, 有 3 只受体产 1 只仔, 1 只受体产 2 只仔, 1 只受体产 3 只仔, 这些仔鼠只有 1 只成活, 其余全部被母亲吃掉或咬死, 而双侧输卵管移植的受体只有 1 只产了 3

只仔鼠,其余均产仔在 5 只以上,仔鼠全部成活,说明产仔数量较少时,容易引起仔鼠死亡,这可能是小鼠具有群居性的原因。

从表 3,表 4 可以看出,用 M2 和改良的 M2 培养液作为显微注射及移植工作液,体外培养的囊胚率差异极显著,分别为 17% 和 35% ($P < 0.01$),体内发育的情况也与这一结果相似,妊娠率分别为 35.9% 和 62.5% ($P < 0.05$)。表明改良的 M2 培养液的成分结构更适合小鼠胚胎发育的要求。说明牛磺酸对克服昆明小鼠胚胎 2 细胞阻滞起关键作用,而 EDTA 具有很好的协同作用^[6,7]。葡萄糖和磷酸

盐对小鼠 2 细胞发育有阻滞作用^[8]。

综上所述,建议在进行转基因小鼠生产时,为提高妊娠率及仔鼠成活率,用改良的 M2 培养液作为显微注射及移植工作液,挑选状态良好的受体,在背部作一切口,尽量减少出血,进行双侧输卵管移植。小鼠饲养室进行人工控制温度和光照,保持通风良好,受体在进行移植时,麻醉要恰当,要观察卵巢有无排卵点,有排卵点的进行移植,移植时动作要轻而快、准。移植后的受体要加强饲养管理,这样才有望提高妊娠率及仔鼠成活率,生产出大量的转基因小鼠。

致谢: 本文经中国科学院动物研究所张家新博士审阅,特此致谢!

[参考文献]

- [1] Palm iter R D, Brinster R L, Hammer R E, et al Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with a metallothionein-growth hormone fusion gene[J]. Nature, 1982, 300: 611- 615
- [2] 卢圣栋 现代分子生物学试验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993 518- 540
- [3] Hogan B, Beddington R, Costantini F, et al Manipulation the mouse embryo, A Laboratory Manual[M]. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1994 130- 135
- [4] Wong R W, Sham M H, Lau Y L, et al An efficient method of generating transgenic mice by pronuclear microinjection[J]. Mol Biotechnol, 2000, 15(2): 155- 159
- [5] 王敏康, 张 田, 王晓燕, 等 几种克服昆明小鼠 2 细胞胚胎发育阻滞的培养液研究[J]. 动物学报, 2000, 46(1): 81- 87.
- [6] Devreker F, Hardy K. Effects of glutamine and taurine on preimplantation development and cleavage of mouse embryos *in vitro*[J]. Biology of Reproduction, 1997, 57: 921- 928
- [7] Gardner D K, Lane M. A alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters[J]. Human Reproduction, 1996, 11: 2703- 2712
- [8] Schmi S A, Bavister B D. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose[J]. Biol Reprod, 1988, 39: 1183- 1192

Influence of different means of embryo transfer and media on the production of transgenic mice

SHI Hong-cai¹, Mayila¹, HUANG Jun-cheng¹, LIUM ing-jun¹, LI Jian-hua², GUO Zhi-qin¹

(1 Key Laboratory of Animal and Veterinary Biotechnology of MOA, Urumqi, Xinjiang 830000, China;

2 Department of Animal Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: The production of transgenic mice by pronuclear microinjection was influenced by a lot of factors. In this paper, the research on the influence of different means of embryo transfer and media was highlighted. The pregnant rate by transplanting to one oviduct or two oviducts had no significance (34.4% and 37.5% respectively, $P > 0.05$). However the difference of surviving rate of pups was significant (83.6% and 97.2% respectively, $P < 0.05$). The blastocyst rate *in vitro* culture with M2 media and modified M2 media was extremely significant (17% and 35% respectively, $P < 0.01$). The case of *in vivo* was also similar to that of *in vitro*, pregnant rate was 35.9% and 62.5% respectively ($P < 0.05$). This result demonstrated that the composition of modified M2 media is more suitable for the development of mouse embryos.

Key words: micro injection; transgenic mice; embryo transfer