

- [13] Liu D. et al., 1998, *Nat Genet*, **20**(4):377-380.
 [14] Ravnik SE. et al., 1999, *Dev Biol.*, **207**(2):408-418.
 [15] Dong Liu. et al., 2000, *Dev. Bio.*, **224**:338-400.
 [16] Moons DS. et al., 2002, *Endocrinology*, **143**(2): 647-654.
 [17] Zhang Q. et al., 1999, *Endocrinology*, **140**(6): 2790-2800.
 [18] Beumer TL. et al., 2000, *Biol Reprod.*, **63**(6): 1893-1898.
 [19] Tong W. et al., 2001, *Mol Cell Biol.*, **21**(4): 1319-1328.
 [20] Heikinheimo O. et al., 1995, *Hum Reprod*, **10**(3):699-707.
 [21] Murphy M. et al., 1997, *Nat Genet.*, **15**(1):83-86.
 [22] Winston N. et al., 2000, *Dev Biol.*, **223**(1):139-153.
 [23] Josefsberg LB. et al., 2001, *Biol Reprod.*, **64**(3):871-878.
 [24] Yang ZM. et al., 1997, *Biol Reprod*, **56**(2):368-379.
 [25] Yang ZM. et al., 1995, *Mol Reprod Dev.*, **42**(4):407-414.
 [26] Das SK. et al., 1999, *J Mol Endocrinol.*, **22**(1): 91-101.
 [27] DeLoia JA. et al., 1997, *Placenta*, **18**(1):9-16.
 [28] Yang ZM. et al., 1996, *Mol Reprod Dev.*, **43**(4):470-476.
 [29] Geum D. et al., 1997, *Mol Reprod Dev.*, **46**(4):450-458.
 [30] Stephanie R. et al., 2000, *Endocrinology*, **141**(2):637-648.
 [31] Burns KH. et al., 2001, *Endocrinology*, **142**(7):2742-2751.
 [32] Kong M. et al., 2000, *EMBO J.*, **19**(6):1378-1388.
 [33] Yue ZP., Yang ZM. et al., 2000, *Biol Reprod.*, **63**(2):508-512.

盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 细胞的分化及其调控*

付卓敏 侯连生**

(华东师范大学生命科学学院 200062 上海)

盘基网柄菌的发育过程类似于多细胞的胚胎发育,有着严格的时间和空间的发育程序,并且受到精密的调控。研究该过程中其细胞类型分化的调控机制对搞清高等生物发育中细胞类型分化机制也有启发作用。而且网柄菌多细胞发育阶段所需的基因与其营养生长所需的基因完全不同,即在不同的发育期,细胞启动不同的基因。这样就便于利用基因的分析方法分析这些基因及其产物,也容易用免疫方法研究细胞内外信号如何启动具发育特征的基因。这样得到的结果无疑具有重要的理论价值和医学价值。为此,本文对这一与细胞分化相关的细胞类型的研究动态作一概述。

一、生物学特征

盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 隶属原生动物门肉足超纲,是一种“社会阿米巴”(social amoeba)。它们生活在潮湿、温暖及富有腐殖质的环境里,以细菌为生。实验室培养可用革兰氏阴性细菌喂养,也可接种在富含有机物的液体培养液中。单倍体细胞在有食物条件下,以二分裂方式繁殖后代。当食物耗尽时,进入多细胞发育阶段,整个发育过程约需 24 小时,其中包括细胞类型的分化。其发育过程大致可分为 4 个阶段:

(1) 细胞聚集 (aggregation) 阶段 当把食物移走后,饥饿细胞分泌一种诱导细胞迁移的化学信号 cAMP,诱导邻近的饥饿细胞形成细胞流向 cAMP 来源方向移动。

(2) 细胞丘 (mound) 阶段 细胞流样结构向聚集中心聚集并最终形成由多细胞组成的丘状结构,该阶段的细胞已有初步分化。

(3) 假原生质团或蛞蝓体 (slug) 阶段 细胞丘垂直向上延伸形成指状突出,这一指状结构随后倒向基质,形成“蛞蝓”。它能向光、热或多种化学源方向迁移,在蛞蝓体迁移过程中细胞得到进一步分化。

(4) 子实体 (fruiting body) 形成阶段 蛞蝓体迁移到一个合适的地方后停止迁移,形成子实体。子实体包括由空泡状细胞组成的坚硬的柄和基盘,支持着一团含有大量休眠孢子的顶囊,约有 10 万个细胞参与形成子实体。

盘基网柄菌发育到蛞蝓体阶段时,特殊细胞类型的分布已很明显(图 1)。遗传性一致的细胞群分化成几个亚群:前孢子细胞 (prespore cell),其大部分细胞将分化形成孢子细胞,约占整个蛞蝓体的 80%;而前端约占蛞蝓体 20% 的细胞为前柄细胞 (prestalk cell) 则分化为柄细胞,组成子实体的柄和基盘。以 *ecmA/LacZ* (*ecmA* 编码一种细胞外基质蛋白) 的表达产物为依据,又可将前柄细胞类群再分为几个亚群:

(1) 前柄细胞 A (prestalk A cells, *pstA*, *ecmA/LacZ*) 位于前柄细胞区最前端约 1/5 处。

* 国家自然科学基金资助项目(批准号:30170107)。

** 联系人。

(2) 前柄细胞 O (prestalk O cells, pstO, ecmO/LacZ) 位于 pstA 细胞区与前孢子细胞区之间。

(3) 前柄细胞 B (prestalk B cells, pstB, ecmB/LacZ) 其中一部分位于蛞蝓体的最后端, 数量比较少, 亦称“后卫”(rearguard cells) 细胞; 此外在前柄细胞与前孢子细胞分界处也有一条形 pstB 细胞类群分布区^[1]。

(4) 前柄细胞 AB (prestalk AB cells, pstAB, ecmA, B/LacZ) 位于前柄细胞区前端一锥形区内, 因其既能表达 ecmA, 又能表达 ecmB^[2] 而被称为 pstAB 细胞群。

(5) 类前端细胞 (anterior-like cells, ALCs) 遍布整个蛞蝓体且与前柄细胞有许多相似的特征。ALC 区细胞组成约 10% 的前孢子细胞, 并且在调控和维持细胞类型比率方面起重要作用^[3]。ALC 区细胞最终分化形成环绕孢子团的顶部和下部的杯状物。pstA、pstB 和 ALCs 细胞群联合起来形成基盘, 将子实体与其附着物连在一起。

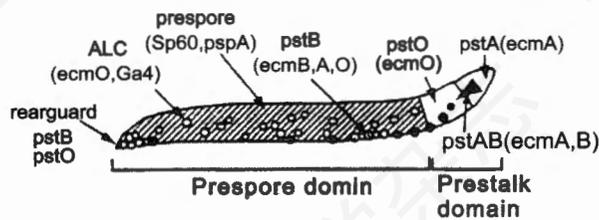


图1 蛞蝓体阶段细胞类型分布模式^[4]

以 ecmA/LacZ 的表达产物为依据, 将前柄细胞类群分为几个亚群(图解说明, 详见正文)。

二、细胞类型的分化

1. 前柄细胞的分化

细胞丘形成以后, 发育的“闸门”也开启了。cAMP 的浓度增加导致由 cAR1 受体介导的细胞聚集阶段通路的持续适应, 由此抑制了细胞聚集所需成分的表达^[5]。但相同饱和剂量的 cAMP 却激活了另一条依赖 cAMP 受体(不依赖 G 蛋白)的通路, 并激活了转录因子 GBF 和 Dd-STATa^[6], 因为细胞类型特定基因的表达需要 GBF 的功能。受 cAMP 作用后, Dd-STATa 迅速发生酪氨酸磷酸化, 并随即转运到细胞核中。Dd-STATa⁻ 细胞的细胞核抽提物中, 含有一种能和 ecmA 启动子激活元件相结合的 DNA 结合活性蛋白。蛞蝓体期, 最前端的 pstA 区细胞中 Dd-STATa 在核中的定位能力比较强, 在 pstO 区和 ALC 区细胞中的定位则较弱, 而前孢子

细胞中则没有或只有极少量 Dd-STATa 定位到细胞核中。在体外, Dd-STATa 能与 ecmA 启动子的一个活性元件及 ecmB 启动子的两个阻遏元件相结合^[7]。若 ecmA 启动子的活性元件发生突变, Dd-STATa 就丧失了 DNA 结合功能, 则 ecmA 就不能表达。而当 ecmB 的两个阻遏元件发生突变时, Dd-STATa 也丧失了 DNA 结合功能, 其结果是 ecmB 在整个前柄细胞区及 ALC 细胞区发生异位表达。Dd-STATa⁻ 细胞类群中, 在整个前柄细胞区都能观察到 ecmB 的表达, 这与上述 ecmB 突变体中出现的结果类似。因此推测结合到 ecmB 启动子上的 Dd-STATa 可能对蛞蝓体期 ecmB 的表达起抑制作用。在 Dd-STATa⁻ 细胞中 ecmA 能够正常表达, 不过在整个前柄细胞区都能看到 ecmO/LacZ 有表达迹象, 这可能是因为 Dd-STATa⁻ 细胞在聚集期有细胞运动缺陷, 结果其细胞类群不能迁移到正确的位置, 导致细胞类型出现分类错误。也有可能 ecmB 的异位表达和其他一些基因抑制了前柄细胞的正确分化, 亦或是它们不能识别细胞类型分化所需的信号。

2. 前孢子细胞的分化

上述的前柄细胞类群的正确分化有利于诱导前孢子细胞的分化。在多细胞发育过程中前柄细胞和 ALC 细胞中都有 spn (Spalten) 的表达, 该基因编码一个偶联有 PP2C 磷酸酶区的 α 亚单位的 G 蛋白。剔除 spn 的细胞在发育时被阻断在紧密细胞丘时期。Spn⁻ 细胞中, 只要 spn 磷酸化酶区表达就能恢复前柄细胞的分化, 说明磷酸化酶区是 spn 的效应部位。表明 spn 特定的作用底物的脱磷酸化是前柄细胞分化过程中的一个限速步骤。剔除 G 蛋白 α 亚单位的研究中发现 PP2C 区的活性受 G_{α} 调控, 或者说至少部分是由鸟苷酸调控的。最近发现能使 spn⁻ 细胞发育成子实体的第二位点抑制基因——ARCK1 (L. Aubry 等, 观察结果尚未公开发表), 它编码一个具有类似于后生动物中 Raf-1 的结构域的激酶, 并含有锚蛋白重复序列。ARCK1 可能与 spn 竞争同一底物。由 Spn⁻ 细胞与野生型细胞或 pslA⁻ 细胞(不能分化形成前孢子细胞的突变细胞)组成的嵌合体发育时, spn⁻ 细胞会分化形成前孢子细胞, 但不能分化形成前柄细胞。前柄细胞和/或 ALC 区细胞的分化需要 spn 作用, 以此来诱导相邻细胞分化形成前孢子细胞。由此可见, 前柄细胞和前孢子细胞的分化都需要 spn。

前孢子细胞的分化还需要另一种基因 pslA 的参与。根据它在细胞核中定位可推测 pslA 可能参

与调控基因表达。*pslA*⁻细胞在聚集时会形成细长的细胞流,沿着细胞流方向形成一些突起,这些突起向前延伸呈指状并分化形成前柄细胞,其后部约有50%的细胞不能分化。不论是在发育细胞中还是在应答体外cAMP的刺激时,*pslA*⁻细胞中都没有观察到前孢子/孢子细胞的基因表达。*pslA*⁻细胞与*spn*⁻细胞表型明显不同:前者即使与野生型细胞混合后共发育也不能分化形成前孢子细胞,这说明*pslA*在前孢子细胞分化中起细胞自主性调控作用。并且由*PsIA*⁻细胞组成的多细胞生物体中前柄细胞的发育模式也受到影响:*ecmAO/LacZ*只在蛞蝓体前端的一小块区域里有表达,而在整个蛞蝓体的大部分细胞中(尤其是*pstA*区最为明显)*ecmO/LacZ*和*Gα4/LacZ*(ALC细胞的标志物)发生错位表达,与正常发育模式不同。表明前柄细胞或许需要*PsIA*蛋白来感受维持细胞类型比率平衡所需的那些负反馈信号。

三、细胞分化的诱导因素

1. cAMP的诱导

网柄菌进入多细胞发育阶段后,那些有聚集潜能的阿米巴,会随着cAMP受体的增加而迅速激活腺苷酸环化酶活性,分泌新合成的cAMP到细胞外基质,造成cAMP局部浓度增高,形成cAMP浓度梯度。cAMP的分泌速率与细胞内的cAMP成正比。cAMP与受体结合的过程,腺苷酸环化酶的激活与cAMP的分泌统称为cAMP接转。作为接转反应的结果,细胞聚集中心的一个细胞或一群细胞分泌的cAMP呈周期性脉冲波,其结果是cAMP波从细胞聚集中心逐渐向边缘扩散。每个阿米巴细胞对于进一步的cAMP脉冲有约3分钟的不应答期。这种暂时性的“聋”防止了细胞受自身信号和相邻细胞发射的信号干扰。只有当信号已到达听不见的地方,阿米巴才会对来自中心的新信号敏感。当cAMP波及邻近细胞时,除了能启动cAMP接转反应外,阿米巴(对cAMP浓度梯度异常敏感)还能沿cAMP梯度向细胞聚集中心运动。大量证据证明所有特定类型细胞的诱导分化起初都需要经cAMP的作用,它能诱导多细胞发育早期的基因表达。cAMP接转和网柄菌对cAMP浓度梯度的趋化性运动调节了多细胞形态发育的许多过程^[8]。

2. DIF-1的诱导

DIF-1与cAMP一样也是由饥饿且聚集的阿米巴细胞释放的。cAMP和DIF-1的共同作用,都是

可以调控细胞类型的分化。但是,若在发育过程中同时使用cAMP和DIF-1则会影响细胞的分化方向。例如,当发育细胞在cAMP作用下,启动多细胞发育的早期基因表达。随后只要有少量cAMP存在,就能诱导前孢子细胞基因*pspA*和*sp60/cotC*的表达。但若同时有DIF-1存在,则会抑制前孢子细胞的表达,转而诱导前柄细胞基因*ecmA*的表达^[9]。cAMP作用后,在DIF-1的诱导下前柄细胞基因*ecmB*也会表达,但与*ecmA*不同的是,若此时继续存在cAMP则*ecmB*的表达受到抑制^[10]。

3. 细胞周期的影响

饥饿时细胞所处的细胞周期阶段也能影响细胞的分化。饥饿时,处在S期和早G₂期的细胞将分化形成前柄细胞(盘基网柄菌细胞周期中无G₁期),而处在细胞周期其余阶段的细胞则分化形成前孢子细胞^[11]。用药剂处理饥饿细胞以延长S期,则会使形成的蛞蝓体中前柄细胞的数量增多。若将处在S期或早G₂期同步化的细胞作为纯种培养时,则会形成一个前柄细胞数量失调的多细胞生物体^[12]。若将这些同步化细胞与未同步化细胞混合培养时,它们则倾向于分化成前柄细胞。同样的,将中/晚G₂期同步化细胞与未同步化细胞混合培养时,这些同步化细胞则倾向于分化成前孢子细胞。目前,关于细胞周期与细胞类型分化方面的功能性联系还不清楚。可能是因为与细胞周期偶联的cAMP接转成分的调控能够影响饥饿细胞开始向cAMP来源方向迁移的时间。这种时间上的不同能迅速地使聚集细胞产生形态建成素信号,而这些信号能影响细胞进入细胞丘阶段的发育。

此外,在协调细胞群体中的事务时,还有更多的低分子量物质被释放用以传播信息。例如,迁移中的蛞蝓体顶端的cAMP产生腺苷酸抑制了该位置上孢子细胞的分化。总之,盘基网柄菌是在各种不同的化学和物理因素的共同作用下决定细胞的分化方式和特异性细胞类型的产生的,而不是任何单个因子作用的结果。

四、细胞类型分化的调控

细胞表面有cAR1、cAR2、cAR3和cAR4等(已证实)四种cAMP受体异构体,对于这几种受体调控细胞类型分化的作用已有初步认识。

cAR1是调控饥饿细胞聚集的主要受体,在整个发育过程中都表达^[13]。在细胞丘形成早期,cAR2在*pstA*细胞中表达^[14]。那些不能表达cAR2

的细胞则被阻断在细胞丘阶段,不能形成指状结构。尽管 $cAR2^-$ 细胞中有前柄细胞标志物 $ecmA$ 和 $ecmB$ 表达,但与野生型细胞相比, $ecmB$ 的表达量有所下降,而前孢子细胞的标志物 $pspA$ 的表达量则增加了 10 倍之多。由于前柄细胞仅占整个蛞蝓体的 20% 左右,因此前孢子细胞表达量的急剧增加不单单是由于前柄细胞转化形成了前孢子细胞的结果。通过比较我们发现,与 $cAR1$ 和 $cAR3$ 相比, $cAR2$ 使 $cAMP$ 调节由 $DIF-1$ 诱导的前柄细胞基因表达的能力更强。这些结果说明 $cAR2$ 的表达是前柄细胞群形成的早期步骤,而这些细胞的进一步分化则依赖于 $DIF-1$ 。

$cAR4^-$ 细胞中前孢子细胞基因表达量显著增加,而 $ecmA$ 和 $ecmB$ 的表达则急剧减少。不过 $cAR4^-$ 细胞能完成发育,但蛞蝓体和子实体形态发生出现异常,前孢子细胞位于在正常情况下是前柄细胞所在的位置上。这时,即使有外源的 $cAMP$ 和/或 $DIF-1$ 作用也不能恢复这种形态上的缺陷,说明 $cAR4$ 在两种细胞类型基因的表达中都起细胞自主性调控作用。

盘基网柄菌中有一种 $GSK-3$ 的同源物 $gskA$ 。同在高等真核生物中一样,这种丝/苏氨酸激酶在细胞命运决定中起重要作用。通过多个受体的 $cAMP$ 信号似乎被整合以精确调控每个细胞中 $GSKA$ 的活性, $GSKA$ 能诱导前孢子细胞的分化。 $gskA^-$ 细胞中,前柄细胞表达量明显增加,而前孢子细胞的表达量则减少了,大部分细胞分化形成基盘柄/柄细胞,结果发育形成的多细胞生物体具有一个大的基盘。体外实验也证明,发育细胞应答 $cAMP$ 的趋化性刺激时,需要 $GSKA$ 蛋白抑制柄细胞的分化而正确诱导孢子细胞基因的表达^[15]。当用 $LiCl$ 处理野生型细胞($LiCl$ 能抑制 $GSKA$ 的表达),则会使它出现与 $gskA^-$ 相似的缺陷表型,这进一步说明 $GSKA$ 参与诱导前孢子细胞的分化而对前柄细胞的分化起负调节作用。

$cAR3^-$ 细胞具有与 $gskA^-$ 细胞相似的表型。 $cAR3^-$ 细胞中,前柄细胞表达量急剧增加,而前孢子细胞表达量减少。如前所述,野生型细胞受外源 $DIF-1$ 诱导后会分化形成前柄细胞,但有 $cAMP$ 存在时,则会阻断前柄细胞的分化。但在 $gskA^-$ 或 $cAR3^-$ 细胞中却不会出现这种情况。即使 $gskA^-$ 细胞中 $cAR3$ 过量表达也不能恢复 $cAMP$ 对前柄细胞分化的抑制作用。并且经 $cAMP$ 作用以提高 $GSKA$ 激酶的活性时也需要 $cAR3$ 的帮助,说明 $GSKA$ 位

于 $cAR3$ 的下游。此外, $cAR3^-$ 细胞中细胞类型的分化以及形态上的缺陷程度比 $gskA^-$ 细胞中要轻的多。或许是由于 $gskA$ 的基础活性亦或是其他 $cAMP$ 受体部分地补偿了因 $cAR3$ 缺失而丧失的那部分功能。

$cAR2^-$ 和 $cAR4^-$ 细胞的表型与 $gskA^-$ 细胞表型相反。通过不断提高 $LiCl$ 的浓度处理 $cAR4^-$ 细胞,可使其前柄细胞和前孢子细胞的表达量逐渐恢复到野生型细胞的表达量,说明 $cAR4$ 对 $GSKA$ 起负调控作用。在体外实验中, $cAMP$ 对 $cAR2^-$ 细胞的柄细胞分化的抑制作用明显强于野生型细胞,说明 $cAR2$ 对 $GSKA$ 同样起负调控作用。

其他一些蛋白激酶在盘基网柄菌发育中也起重要作用。饥饿细胞聚集时,PKA 和 MAP(促分裂原活性蛋白)激酶 ERK2 既是 $cAMP$ 信号传递系统中的基本成分,也是特定细胞类型的基因表达必需成分。PKA 蛋白在前柄细胞和前孢子细胞的分化过程中也具关键作用。PKA 调节亚单位发生负显性表达,即 PKA 不能与 $cAMP$ 结合,结果两种细胞类型的分化都会出现障碍。而剔除 PKA 催化亚单位的细胞虽然不能发生聚集,但仍可检测出有应答 $cAMP$ 刺激的细胞类型特定基因的表达。不过某些前孢子细胞标志物如 $pspA$ 的表达却不依赖于 PKA 的作用。在整个发育过程中 PKA 的活性也受一些能够影响胞内 $cAMP$ 的浓度的蛋白的调控,ERK2 就是其中之一。

五、展望

目前对盘基网柄菌在细胞类型诱导和分化方面的调控机制有了一些了解,但仍有许多问题有待于进一步研究。如细胞周期影响细胞分化的调控机制还不是十分清楚,究竟是什么因子影响了发育过程中细胞的分化,值得我们深入研究;特别是营养期细胞转化为发育细胞的过程中,细胞体内发生了什么变化,还不是很清楚,我们推测除了 $cAMP$ 作用外,可能还有其他因素起作用。所以我们认为在细胞发育过程中,除文中已详细描述的四类 $cAMP$ 受体外,或许还有其他受体也参与了细胞类型的诱导和分化。因此分析细胞早聚集期阶段基因的启动子及其作用因子可能有助于解决这个问题。并且若能进一步研究各种不同的突变体并纯化出一种能抑制 $DIF-1$ 合成的突变株加以研究,将有助于了解前柄细胞分化的早期过程。通过纯化并鉴定出前柄细胞分泌的细胞外因子可能有助于解决前柄细胞类群对

前孢子细胞分化的影响。此外,cAMP 与其受体作用后,影响其下游的什么物质也值得我们去进行深入的研究。

摘要

本文综述了盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 发育过程中细胞类型的诱导和分化,细胞外 cAMP 及其四种位于细胞表面的受体及 PKA(蛋白激酶 A)、GSK-3(糖原合成酶激酶)和 STATa 等在网柄菌发育过程中的作用。

参考文献

[1] Aubry L. et al. , 1999, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* , 15:

469 - 517.

[2] Caccarelli A. et al. , 1999, *Cell* , 65: 983 - 989.

[3] Abe T. 1994, *Cell* , 77: 687 - 699.

[4] Jason M. et al. , 1999, *Dev. Biol.* , 216: 426 - 441.

[5] Abe K. et al. , 1983, *Dev. Biol.* , 95: 200 - 210.

[6] Araki T. et al. , 1998, *EMBO J.* , 17: 4018 - 4028.

[7] Harwood A.J. et al. , 1993, *Dev.* , 118: 1041 - 1048.

[8] Dona R. 1998, In the Principles of Cell Adhesion, CRC Press.

[9] Fosnaugh K. L. et al. , 1991, *Dev. Genet.* , 12: 123 - 132.

[10] Berks M. et al. , 1990, *Dev.* , 110: 977 - 984.

[11] Clay J.L. et al. , 1995, *Dev.* , 12: 1525 - 1538.

[12] Araki Y. 1997, *Dev. Biol.* , 192: 645 - 648.

[13] Klein P.S. et al. , 1988, *Sci.* , 241: 1467 - 1472.

[14] Saxe C.L. 1996, *Dev. Biol.* , 174: 202 - 213.

[15] Louis J.M. et al. , 1994, *Genes Dev.* , 8: 2086 - 2096.

卵母细胞胞质内注射技术获得胚胎的研究现状

征曰良 仲跻锋 宋 杰

(山东师范大学生命科学学院 济南 250014 山东省农科院生物技术研究中心 济南 250100)

近年来,胚胎的体外生产技术发展迅速,人们把生殖细胞(如精子、精母细胞)或体细胞(如卵丘细胞、胎儿成纤维细胞)的核注入去核卵母细胞,均得到完全发育的后代。卵母细胞胞质内注射技术的发展,对受精过程和核质相互关系的研究,具有重要作用。

一、胞质内精子或精子头的注射

1. 卵母细胞种类和操作温度对注射效果的影响

Uehara 首次进行了仓鼠精子的显微注射实验,并得到发育较好的原核,但仓鼠的卵母细胞在体外难以培养,小鼠的卵和胚胎在体外易培养,但其精子显微注射很困难。小鼠卵母细胞质的黏度不及仓鼠,用注射针刺破小鼠卵膜,胞质会渗出,不久,卵母细胞退化,而用同样方法处理仓鼠的卵母细胞,胞质不会渗出,注射后的大多数卵母细胞仍旧存活。另外,小鼠卵膜的弹性比仓鼠的要大,用注射针刺仓鼠的卵母细胞时,透明带凹入,接着透明带和卵膜迅速被刺破,对小鼠来说,注射针容易刺破透明带,却难以刺破卵膜。当胞膜被刺破后,凹入的卵膜开始复原,破口逐渐愈合。这种复原能力受温度的影响,在温度高(25 - 37℃)时,复原较快,但卵母细胞易退化,这可能是由于卵膜复原到原始位置时,破口还未来得及愈合,周围的培养液进入卵母细胞的缘故。在温度低(17 - 18℃)时,卵质黏度增大,复原过程减

慢,破口有充足的时间进行愈合,阻止了培养液进入胞质^[1]。精子注射后,抽回注射针时,要避免针中的培养液流出,因为这会阻止凹入卵膜的复原。Kimura 等采用向注射针内施加适当负压的方法,来避免这种情况,效果较好^[1]。

2. 精子的制动或精子头的分离

若把活动的精子注入卵母细胞,精子会在胞质内运动一段时间,这可能破坏胞质结构和妨碍卵膜的愈合,因此,在注射前,常常对精子进行制动处理或分离出精子头。制动的办法是:把精子的尾部先吸入注射针,连续地吹吸;或当精子尾的中后段处于注射针中时,施加几个压力脉冲,使精子丧失运动能力。Kimura 等把制动后的精子注入卵母细胞,获得了后代小鼠^[1],而 Kuretake 等用小鼠的精子头进行注射,同样获得了成功^[2]。精子头的分离过程如下:用 Tris 缓冲液(50mmol/L, pH=7.7)制备精子悬浮液,超声处理 10 秒,进行蔗糖梯度离心,收集无尾的精子头,再在 2500×g 下离心洗涤三次,每次 10 分钟。把精子头以 10⁸ 个/ml 的密度悬浮于 Tris 缓冲液中,4℃ 下贮存,48 小时内使用,或分成小份于 -60℃ 下冷冻保存。分离精子头时,精子质膜被破坏,促使精子质膜在卵母细胞内降解,利于精子细胞器与卵质融为一体,从而提高受精率,但这也会使培养液中的大量 Na⁺ 和 Ca²⁺ 进入精子,引起核的迅速降解,进而导致精子死亡,而进入精子的大量 K⁺ 对核的破坏程度相对较小。