[9] Kloner, R. A., et al., 1980, *Experimental and Molecular Pathology*, 32: 317-335.
[10] Rona, G., 1985, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 17: 291-306.
[11] Noronha-Dutra, A. A., et al., 1982, *Laboratory Investigation*, 47(4): 346-353.

小鼠嵌合体制作技术的研究

张锁链　旭日干　斯　琴
（内蒙古大学实验动物研究中心）

自从Tarkowski[1]、Mintz[2]等用聚合法和Gardner[3]用显微注入法分别制作出嵌合体小鼠以来，这项技术作为研究个体发育过程中细胞间的相互作用与基因表达的一种手段，以及研究遗传、免疫机制等方面的动物模型，发展十分迅速。本文以植物血球凝集素P(PHAP)为接合剂，分别将两个不同品系小鼠的和同品系不同个体之间的8细胞期胚聚合为一体，用3种不同的培养液培养后获得了较高的发育率，并把一部分发育为桑椹期或胚泡期的嵌合胚移植给受体小鼠得到了产仔结果。现将实验结果报告如下。

材料与方法

一、实验材料

1．供试动物　包括黑色的C57BL/6J（以下简称C57)小鼠(图版图4b)和白色的中国昆明小鼠(以下简称昆明白)(图版图4a)，均为在本研究中心的全空调标准饲育室饲育的清洁级别标准化动物。饲养温度为18—24℃，湿度为60—70%，光照时间12小时，换气次数12次/小时。饲料是自行配制生产的固型饲料。

2．药品试剂　PMSG（长春生物制品研究所)、HCG(宁波激素制品厂)、BSA(Sigma制品)、链霉蛋白酶(MERCK)制品、PHAP(美国DLDM)。

二、实验方法

实验一　分别选取供卵鼠C57和昆明白(8—12周龄)，用PMSG(5 IU)和HCG(5 IU)以48小时的间隔注射并在注射HCG的当日与同品系雄鼠合笼。次日上午选取有阴道栓的小鼠，并将当日定为妊娠第一天，在妊娠的第三天下午2时进行采卵。用温热的Hanks溶液分别自小鼠子宫和输卵管收集卵子，挑选形态正常的8细胞期胚胎，洗净后移入经37℃温育两小时的含有0.5%链霉蛋白酶的Hanks溶液中，在室温下处理5—7分钟，在透明带溶解后立即取出裸胚在培养液中以5分钟的间隔冲洗3次，充分去除残存的链霉蛋白酶。然后以昆明白←→C57和昆明白←→昆明白的组合取两枚胚胎，分别放进血凝滴淀板小孔内含有0.5%PHAP的培养液中。用细玻璃针使两个胚胎相互靠拢，置于37.5℃ CO_2培养箱内温育20分钟后，移入用灭菌石蜡油复盖的3种培养液，即含有20%的FCS(自制品)的PBS液，含有5 mg/ml BSA的BWW液(Biggers, Whitten & Whittingham)和BMOC-Ⅲ(Brinster)溶液的微小滴中继续培养。培养20—24小时后在立体显微镜下观察嵌合胚的发育，并以发育为嵌合的桑椹胚或嵌合的胚泡数目计算发育率。

实验二　将以PBS添加FCS和BWW加BSA为培养基，用上述方法制作并发育为晚期桑椹胚或早期胚泡的嵌合胚昆明白←→C57和昆明白←→昆明白，按所用培养基不同分别移植给受体小鼠(图版图4c)，观察受胎及产仔结果。受体为比供体交配晚24小时，作假孕处理的10周龄初胎昆明白雌鼠。移植时用10%戊巴比妥钠麻醉，经背部手术将嵌合胚植入子宫角内，每侧移植5—8枚胚。移植胚胎之后的受体小鼠单独饲养管理。

结　　果

1．不同品系的和同一品系的嵌合胚在不同培养液中的发育率：由不同品系的8细胞期胚组成的和由同一品系8细胞期胚组成的聚合胚昆明白←→C57和昆明白←→昆明白，分别在3种不同的培养液，即PBS+FCS、BWW和BMOC—Ⅲ中培养20—24小时后，结果如表1。在昆明白←→C57聚合体(图版图1)中

表 1 不同品系及同一品系组合的嵌合胚在不同培养液中的发育率

品系组合	培养液*	聚合胚数	发育胚及发育阶段		
			计(%)	桑椹胚(%)	胚泡(%)
昆明白←→C57	PBS+FCS	67	59(88.1)	51(86.4)	8(13.6)
	BWW+BSA	121	115(95.0)	102(88.7)	13(11.3)
	BMOC-Ⅲ	77	73(94.8)	61(83.6)	12(16.4)
昆明白←→昆明白	PBS+FCS	30	28(93.3)	21(75.0)	7(25.0)
	BWW+BSA	138	121(87.7)	99(81.8)	22(18.2)
	BMOC-Ⅲ	60	52(86.7)	40(76.9)	12(23.1)

* 培养时间 20—24 小时

表 2 不同品系和同一品系组合的嵌合胚移植后的存活率

品系组合	培养液*	移植嵌合胚数	受体数	妊娠受体数	产仔数、仔鼠性别及被毛分类			
					计(♀:♂)	黑	白	杂
昆明白←→C57	PBS+FCS(A)	25	2	2	12(4:8)	2	2	8
	BWW+BSA(B)	65	6	2	5(1:4)	1	2	2
昆明白←→昆明白	PBS+FCS(C)	22	2	1	2(0:2)		2	
	BWW+BSA(D)	29	2	2	6(2:4)		6	
总数		141	12	7	25(7:18)			

* 培养时间 20—24 小时。

分别有 88.1%(59/67)、95.0%(115/121)和94.8%(73/77)，在昆明白←→昆明白聚合体中分别有 93.3%(28/30)、87.7%(121/138)和86.7%(52/60)的胚发育为形态正常的桑椹胚(图版图 2)或胚泡(图版图 3)。嵌合胚的发育率在以上 6 个处理组之间均无显著差异($p>0.05$)，表明本实验所用的 3 种培养液无论对同一品系或不同品系嵌合胚的发育均有效。

2. 由不同品系组合的和同一品系组合的发育为晚期桑椹胚或早期胚泡的嵌合胚，按使用培养液不同分别移植给受体，结果如表 2。在培养液 A 和 B 中，分别用 2 只和 6 只受体移植嵌合胚 25 枚和 65 枚，结果各有 2 只受体妊娠并分别产仔 12 只和 5 只。在这 17 只昆明白←→C57 嵌合体小鼠(图版图 4)中被毛颜色分别为黑(m)、白(d)和杂色的(e-l)各有 3、4 和10 只；在培养液 C 和 D，各有 2 只受体分别移植昆明白←→昆明白嵌合胚 22 枚和29枚，其中各有 1 只和 2 只受体妊娠并分别产出 2 只和 6 只嵌合体小鼠。在以上 A、B、C、D 4 个组中，嵌合体小鼠的雌雄性别比分别为4:8、1:4、0:2 和 2:4。

讨论

用聚合法制作小鼠嵌合体，操作简便，不需要特殊的仪器设备，是制作嵌合胚和嵌合体动物的有效方法。本研究用 PHAP 试剂，使胚胎在塑料多孔板的孔底达到聚合，其聚合率达到 100%。聚合用培养液很少(0.02—0.04 ml)，在培养液上面加少量灭菌的液体石蜡，不仅具有防止蒸发的作用，而且在移动培养容器时不易使接触在一起的胚胎重新分离。

菅原七郎[4]和館鄰[5,6]等曾用小鼠卵用标准培养液 BWW(或 SEC)为培养基，培养 8 细胞期的聚合胚得到很高的发育率结果。在本研究的预备实验中曾试用过上述两种培养基，但

在BWW中嵌合胚的发育效果不够理想。后来在进行正式实验时将BSA的添加量从1mg/ml增加到5 mg/ml，与此同时还增加了PBS+FCS培养液组合，以便找出组成更简单的发育用培养液。实验结果在6个处理组中嵌合胚的发育率均很高。在整个实验中约有7—12%的聚合胚未能正常发育，其中有的是组成聚合胚的一方发育而另一方不发育，有的则双方均不发育，但还能保持彼此之间的连接而成联体。这些现象可能与聚合用胚胎的损伤或胚胎质量有关，有的胚胎从外形上看不出异常，然而可能有某种内在的因素使其不能正常发育。

本文以与供体非同步的即晚24小时假孕处理的雌鼠为受体所进行的实验，受胎率和嵌合胚的存活率分别为58%(33—100%)和17%(7—48%)，说明用本文采用的方法制作的嵌合胚发育率不仅较高，而且能够发育为正常的个体。另外，在出生的嵌合体小鼠中雄性比例高于雌性，与横山峯介[7]的报道相一致。这是因为XY胚胎上的H-Y抗原的雄性化作用，使得XX-XY嵌合体向雄性发育的结果。

摘　要

本研究采用人工聚合技术，将小鼠不同品系和同品系之间的8细胞胚聚合为一体，分别用PBS+FCS、BWW和BMOC-Ⅲ培养20—24小时后观察了发育率。其结果在昆明白←→C57中分别有88.1%(59/67)、95.0%(115/121)和94.8%(73/77)，在昆明白←→昆明白中分别有93.3%(28/30)、87.7%(121/138)和86.7%(52/60)的嵌合胚发育为桑椹胚或胚泡，各处理组之间无显著差异。将141枚嵌合胚分别移植给12只受体，结果有7只小鼠妊娠共产仔25只。在昆明白←→C57的17只嵌合体小鼠中毛色为黑、白和杂色的各有3、4和10只。

参考文献

[1] Tarkowski, A. K., 1961, *Nature*, 190: 857-860.
[2] Mintz, B., 1964, *J. Exp. Zool.*, 157: 85-100, 273-292.
[3] Gardner, R. L., 1968, *Nature*, 220: 596-597.
[4] 菅原七郎, 1986, 哺乳動物の発生工学実験法, 190-200, 学会出版社センター。
[5] 大沢仲昭、舘鄰等, 1984, 哺乳類の発生工学, 140-149, リフトサイエンス社。
[6] 妹尾左知丸等, 1981, 哺乳動物の初期発生, 359-366, 理工学社。
[7] 横山峯介, 1984, 家畜繁殖学雑誌, 5: 54-60。
[8] 李幼兰等, 1982, 细胞生物学杂志, 3: 34-36。

环氧树脂618和Epon 812引起鼠伤寒沙门氏菌株细胞突变的超微结构研究

戴志强　俞月桂　袁幸菊
(中国科学院上海药物研究所)

环氧树脂因其良好的聚合效果和抗电子轰击稳定性而成为透射电镜生物试样的理想包埋剂。然而近年发现13种环氧树脂包埋剂具有致突变性[1]，因而它们的遗传毒性引起了生物电镜工作者的普遍关注。根据我国卫生部颁布的《新药审批办法》规定，鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames试验)是检测化合物致突变性的首选试验。以此，我们检测了国内电镜实验室

本所病理组协助Ames试验，特此致谢。