

参 考 文 献

- [1] Branton, D., 1966: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 55: 1048.
- [2] 吴玉徽、鲁崎唔、傅广礼, 1979: 生物化学与生物物理进展, 第1期 第46页.
- [3] Stachelin, L.A., 1977: *Brookhaven Symposium in Biology* № 28, 278—315.
- [4] Branton, D., et al. 1975: *Science* 190: 54.
- [5] Arntzen, C. J. and Briantais, J. M., 1975: *Bioenergetics of Photosynthesis* 51—113.
- [6] Armond, P. A. and Arntzen, C. J., 1977: *Plant Physiol.* 59: 398—404.

图版说明

- 图 1 示豌豆叶离体叶绿体经冰冻断裂后的EFu和PFs面 ×75,000
- 图 2 示豌豆叶肉细胞的原生质膜断裂面PS面 ×99,000
- 图 3 示豌豆叶离体叶绿体经冰冻断裂后的EFs EFu和PFs面 ×75,000
- 图 4 示豌豆叶肉细胞中的细胞核(N)核膜上分布有大小不等的核孔(箭头) ×24,000
- 图 5 示豌豆叶细胞质的冰冻断裂面, 从图中清晰可见液泡(V)和线粒体(M)等细胞器 ×15,000

制作小鼠嵌合体的简易方法

李幼兰 李光三 冯燕玲 陆德裕

(中国科学院发育生物学研究所)

自从 Tarkowski (1961, 1963), Mintz (1964), 用胚胎聚合的方法得到了小鼠嵌合体之后, 这一工作在国外受到了普遍的重视。但因哺乳动物的卵子小而脆弱, 要使它在外经受各种实验性处理后, 又回到母体内继续正常发育, 在实验条件上, 要求十分严格, 在技术上要求十分精细。Mintz (1971), 介绍他们用 37°C 使胚胎达到聚合, 用 5% CO₂ 调节培养液的 pH 值。所以实验是在恒温罩内进行, 或在解剖镜上装置恒温台, 并同时备有混合气相装置。该作者 (1973) 又提出用 PHA P (Phytohemagglutinin P) 试剂, 可使胚胎在室温下达到聚合。我们根据国外的经验, 进行了改变和简化, 结果证明, 效果良好, 简便易行, 现将此法具体步骤及结果作一介绍。

材 料 和 方 法

卵子的获取:

白色毛小鼠的受精卵取自昆明白♀×昆明白♂, 黑色毛小鼠的受精卵取自C₅₇♂×昆明白♀或C₅₇♀×C₅₇♂。实验用小鼠年龄为5—6周。超排卵者于

午后4:00注射孕马血清5 i.u., 48小时后注射绒毛膜促性腺激素5 i.u., 随即放入雄鼠罐内待配, 一雄配一雌。自发排卵者, 经检查阴道涂片后, 取动情期小鼠放入雄鼠罐待配。次日清晨检查阴栓。

第三天(以见阴栓为胚胎发育的第一天), 取出两侧输卵管冲洗, 即可得8细胞期胚胎, 超排卵者卵子数量要比自发排卵者多1—2倍, 而其发育阶段远不如自发排卵者整齐。

冲洗、培养和移植用溶液为哈培氏液(Hoppe 1973), 去透明带溶液为酸性泰洛氏液(Tyrod's solution) pH 2.0—2.5 (Nicholson 1975)。冲洗卵子前, 将备用之溶液分置于小培养皿或小玻璃方杯中, 加盖, 但不要密闭, 置37°C含5% CO₂和95%空气的温箱中预热, 使其pH调到中性(以培养液中酚红颜色决定)。

胚胎的聚集:

将预先配制的1%琼脂(1克琼脂粉溶于100毫升蒸馏水)加热溶化, 在已消毒的小玻璃方杯(或小培养皿)的底上, 均匀地倾倒一层, 约厚1—2毫米, 待凝后, 用细白金丝在微焰灯上烧热, 在冷却的琼脂面上烫成一排排的小凹陷, 其直径略大于2个胚胎,

* 文中照片由李建荣同志拍摄。

深度约能容纳4—5个胚胎为宜。然后盛以Hoppe氏液,置37℃含5%CO₂和95%空气的温箱中待用。每一个方杯中的琼脂小凹陷不宜太多,以10个左右为宜,以免聚集时在室温下操作过长。

取8细胞期胚胎,置酸性Tyrode氏液内,在解剖镜下观察,见透明带消失,立即取出,以Hoppe氏液洗2—3次。每次最多处理2—3个胚胎,因为每个卵子的透明带对酸性溶液的反应有快慢之差,每次处理太多,会使透明带消失快的卵子受到损伤。来自黑白小鼠的两种受精卵分别去膜后,迅速从两种胚胎中各取一个置于预热的琼脂小凹陷内,使两个胚胎紧靠,然后放入37℃含5%CO₂和95%空气的温箱中,半小时后复查一次,将未靠近的胚胎再用钝头针使它们彼此接触。继续培养24小时。

假孕鼠为昆明白雌鼠,经阴道涂片检查,选动情期者与昆明白结扎输精管雄鼠配,配种时间比供胚胎鼠晚24小时。将已聚合并发育至桑椹胚晚期或胚泡期的胚胎移至假孕鼠子宫,最好作双侧移植,可以提高种植率。移植过程如下:将假孕小鼠麻醉,待其安静后,在背部脊椎两侧去毛,进行皮肤消毒,做纵向切口,拉出子宫,用金属注射针将子宫壁穿一小孔,把已吸入胚胎的玻璃注射针从此孔插入子宫腔,将胚胎吹进子宫腔中,最后缝好切口。

结果与讨论

按照上述方法在琼脂小凹陷中聚合,一般都可以聚合而发育至一个圆形而正常的晚期桑椹胚或早期胚泡(图版图1—3)。表1是用

此法聚合8细胞期的聚合率,在9次聚合的实验中,其中4次100%能发育为一个完全正常的桑椹胚或胚泡。根据我们的经验,假若卵子质量不好,分裂球很容易散开,聚合率降低。又因为我们不是在37℃和有CO₂供应的条件下操作的,所以在操作过程中,速度迅速至关重要。表1中其余5次聚合率稍低,可能与这两种原因有关。我们曾试用37℃保温台在解剖镜下聚合,由于培液在空气中很快变碱,聚合和发育均受到严重阻碍。若不用琼脂小凹陷,聚合的胚胎放置在盛Hoppe氏液的小玻璃方杯中放入温箱时,因位置的移动会使胚胎大部分离开。PHAP目前在国内尚没有生产,所以用琼脂小孔聚合胚胎则是一个简便易行的方法。

移植胚胎的结果见表2。聚合后胚胎的成活率约为50%,所得的27只小鼠都发育到正常成年个体,4只黑白嵌合体中2雌2雄,雌雄均能繁殖后代。由于我们的黑色小鼠量很少,不能每次用来自黑白两种小鼠的胚胎聚合,但为了测定这种聚合方法对胚胎发育是否有影响,所以也将由昆明白与昆明白聚合后的胚胎进行了移植,因此,表2中所得的白色小鼠没有指标证明它们是白白嵌合体还是只有一个胚胎参予的个体,故这个数字尚不能代表所得嵌合体的百分数,只能说明通过这一系列处理后胚胎的存活率。

表1 8细胞期胚胎聚合率

实验次数	小鼠品系	聚集胚胎数	晚期桑椹胚和早期胚泡数
1	昆明白♀ × 昆明白♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	5	5
2	昆明白♀ × 昆明白♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	15	13
3	昆明白♀ × 昆明白♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	12	11
4	昆明白♀ × 昆明白♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	5	4
5	C ₅₇ 黑♀ × C ₅₇ 黑♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	16	14
6	昆明白♀ × C ₅₇ 黑♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	18	18
7	昆明白♀ × 昆明白♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	20	18
8	C ₅₇ 黑♀ × C ₅₇ 黑♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	15	15
9	C ₅₇ 黑♀ × C ₅₇ 黑♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	4	4
总 数		110	102(92.72%)

表 2 移植胚胎的存活率

实验次数	小鼠品系	移植胚胎数		养母数	产仔数	
		聚合的桑椹胚或胚泡	对照桑椹胚或胚泡		黑嵌合体	白色小鼠
1	昆明白♀ × 昆明白♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	10	0	1		6
2	昆明白♀ × C ₅₇ 黑♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	4	6*	1	2	5
3	昆明白♀ × 昆明白♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	20	0	1		10
4	C ₅₇ 黑♀ × C ₅₇ 黑♂ + 昆明白♀ × 昆明白♂	10	0	1	2	2
总数		44	6	4	4	23

* 因本次实验仅有 4 个聚合胚泡, 不足以移至一只小鼠, 故在一侧移植了来自白色小鼠的未经聚合的胚泡 6 个。

参 考 文 献

- [1] Tarkowski, A. K., 1961 *Nature, Lond.*, 190: 857—60.
- [2] Tarkowski, A. K., 1963 *J. Natl. Cancer Inst Monograph*, 11: 51—57.
- [3] Mintz, B., 1964 *b. J. Exp. Zool.*, 157: 85—100.
- [4] Mintz, B., 1971 *Allophenic mice of multi-embryo origin*, *Methods in Mammalian Embryology*, W. H. Reeman and Company San Francisco.
- [5] Mintz, B. Gearhart, J. D. et al. 1973 *Dev. Biol.* 31: 195—9.
- [6] Nicholson, G. L., Yanagimachi, R. et al., 1975 *J. Cell Biol.* 66: 263—274.

一台自制的激光漂白荧光恢复测量装置*

张孔华 孙伟利 张伯新

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

细胞表面的蛋白质是能够侧向运动的, 那末, 它的运动方式是扩散还是流动? 如果是扩散, 它的扩散系数是多少? 1974年蒲慕明等用光漂恢复法测出了视网膜视杆外节盘膜中视紫红质的扩散系数^[1]。同年, Peters等利用荧光素能被光漂以及异硫氰基荧光素能与膜蛋白结合的特点, 测定了红细胞膜蛋白的扩散系数^[2], 从而扩大了光漂恢复技术的应用范围。以后, Jacobson等又改用了激光光源, 改为激光漂白恢复测定(fluorescence photobleaching recovery, 简称FPR)或称荧光漂白后恢复测定(fluorescence recovery after photobleaching 简称FRAP)^[3]; 并在理论上进行了分析^[4]和探讨了激光可能引起的生物效应^[5], 使这一方法渐趋完善和可信, 因此应用的

人也逐渐增多。但目前这种装置还没有商品出售。我们根据以下原理完成了本装置**。

基本原理

FRAP方法的基本原理参见图1。先将待测细胞的表面特定物质用荧光标记, 洗去多余的荧光物质。选择适当的激光束波长通过显微镜聚焦在待测细胞表面的一个小区域上。光电倍增管测出标记荧光的荧光强度, 即原始荧光, F_i 。接着用强激光脉冲(光漂脉冲)在瞬时, T_B , 内照射上述小区域以破坏其荧光。光漂脉冲结束时该区域荧光强度降为 F_0 , F_0 的大小显然与漂白程度有关。测定区域的荧光由于该区域内外标记物质的彼此随机扩散运动而逐渐恢复, 最终趋于 F_{∞} , 恢复过程即告完成。