

生的时刻虽然还没有表达出终末期的表现型,但从那时起细胞就开始逐步丧失增殖能力,并一定会达到终末期。定向细胞丧失增殖能力和表达出终末期的表现型这两个过程是相关连和一致的。

半固体培养基上的混合型集落的形成似乎颇为费解。因为混合型集落中似乎含有已丧失增殖能力的终末期细胞,又含有未到达终末期的尚具有一定增殖能力的细胞,而已定向的终末细胞是不可逆转的。我们认为有以下两种可能性可以解释混合型集落的形成:一是可能定向细胞在分裂而形成集落的过程中,其子代的分化不均一,某些子代细胞已达到终末期,表现出联苯胺阳性的终末表现型,而另一些子代细胞尚未达到终末期,呈联苯胺阴性反应。第二种可能是细胞在受到诱导剂充分作用后,细胞尚未定向之时被接种于半固体培养基,经过一

次分裂后,一个子代细胞变成了“定向”细胞,再分裂有限次数达到终末期并构成了集落中的联苯胺反应阳性细胞;另一个“未定向”细胞的子代构成集落中的联苯胺反应阴性部分。实验中对混合型集落的观察和分析结果与后一种可能性更为符合。

参 考 文 献

- [1] Marks, P. A. R. A. Rifkind, 1978, *Ann. Res. Biochem.*, 24:419—448.
- [2] Friend, C. et al., 1971, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68:378—382.
- [3] Gusella, J. et al., 1976, *Cell.* 9:221—229.
- [4] Ostertag, W. et al., 1972, *Nature New Biol.*, 239:231—234.
- [5] Chen, Z. X. et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:471—475.
- [6] Buick, R. N., M. N. Pollak., 1984, *Canc. Res.* 44:4909—4918.

胚胎融合制备四亲体小鼠

杨 翰 仪

(白求恩医科大学)

用两个不同基因型小鼠胚胎在其8细胞阶段进行体外胚胎融合。待融合的胚胎发育到囊胚期时,将其移植于另一种假孕雌鼠子宫腔内。约17天后发育成熟分娩得四亲体小鼠(Tetraparental mouse)。这种小鼠各组织和器官都含有两种来源的细胞群体。

四亲体小鼠是由两种纯种小鼠胚胎融合而成。因而是研究胚胎发育、遗传、免疫机制及老年医学等方面有特殊价值的动物模型。本文将介绍胚胎融合制备四亲体小鼠的方法。

材 料 与 方 法^[1,2]

1. 胚胎的收集 C57 BL/6 J(黑毛, H-

2^b)及A/J(白毛, H-2^b)成年雌鼠,腹腔内注射5iu孕马血清(PMS, Organon), 48小时后,注射溶于生理盐水的人绒毛膜促性激素(HCG)5iu。注射HCG当晚将雌鼠分别与同种雄鼠合笼。次日上午10时前取出雌鼠检查,有白色阴栓者,取出饲养备用。

在发现阴栓两天后,颈椎骨脱臼杀死雌鼠,剖腹取出连有输卵管的上半段子宫,放入盛有Whitten-Bigger液(以下简称W-B液)的小培养皿中。在解剖镜下,将连接盛有W-B液的注射器的30号针头(针尖磨钝),插入输卵管开口处,以约0.2ml的W-B液灌洗输卵管及子宫。届时可见子宫切口处有白色混浊液流出。在流

出液中有发育到8细胞的胚胎(也有少量发育为其他阶段的胚胎)。用拉细的玻璃滴管收集8细胞的鼠胚。将两种来源不同的鼠胚分别放在两个小培养皿中,各用W-B液洗涤三次。

2. 链霉蛋白酶(Pronase)除去透明带 将两种来源的胚胎分别放入含0.5%链霉蛋白酶(Calbiochem产品)的W-B液中,观察透明带的变化。在透明带刚消失时,立即取出无透明带的胚胎,在W-B液中洗涤三次。

3. 胚胎融合 将两不同鼠胚各取1个。用植物血凝素P(PHA-P 1.69 mg溶于10 ml PBS)溶液处理2分钟后,用含0.6%牛血清白蛋白(BSA)的W-B液洗涤一次,然后每二个胚胎放入-石蜡油层下W-B液-0.6% BSA液滴中(石蜡油预先与W-B液混合,搅拌平衡1小时。通入含5%CO₂的空气15分钟,离心200 g 5分钟。然后将油层倒入小培养皿。用拉细滴管将含BSA的W-B液分滴加在油层下面)。在解剖镜下用圆头小玻棒将两个胚胎机械推在一起,使相互接触。然后放入饱和湿度,5%CO₂,37℃孵箱培养约40小时,可观察到已融合的胚胎发育为比正常大约一倍的囊胚期胚胎。此时取出胚胎放入新配的含BSA的W-B液中供移植用。

4. 假孕雌鼠的准备 成年CFI雄鼠作输精管切除术一周后与同种成年雌鼠同笼,次日检查雌鼠阴栓阳性者作为假孕雌鼠用作胚胎接种的载体。

5. 融合胚胎的移植 将假孕雌鼠以戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。置俯卧位,以75%酒精消毒背部皮肤,在背下部正中作一长约1.5 cm的切口。向两侧分离皮肤后,可见肌层下卵巢周围黄色脂肪垫。在该处切一小口穿入腹腔,用钝镊轻轻拉出子宫。用22号针头在子宫上部穿刺一孔入宫腔,再沿此针孔将已融合的胚胎约10个(可混合一半发育时期相同的CFI胚胎)以口径比融合胚胎稍大的微型滴管轻轻送入子宫腔内。注意使随胚胎进入子宫腔的液体尽量少些。接种完毕后将子宫复位。另一侧子



图1 四亲体小鼠(中) A/J(右) C57BL/6J(左)

宫同法移植。然后缝合皮肤。如移植成功,则约十七天后小鼠分娩。待长出毛后,选择有黑白二色毛的小鼠,即为四亲体小鼠(见图1),

用符号C57BL/6J $\longleftrightarrow$ A/J表示其来源。

讨 论

异表型小鼠(allophenic mouse)的制备首先为Tarkowski于1961年描述^[3]。以后Mintz进行改进。由于每支小鼠来自不同基因型胚胎早期的融合,其主要特征是不同的表现型细胞群体共存于一个动物的各组织器官中。在实验中,虽然两种胚胎的细胞是等量进行融合,但不是每一融合胚胎均能发展为四亲体小鼠。因而需要有关于两种基因表现型的证明,如皮毛颜色,H-2抗原的不同等。此外,产生的四亲体小鼠两种基因型细胞的比例也不是按1:1共存,往往各个动物差异很大。这可以用两种来源的细胞发展不平衡,甚至可能完全为某一来源的细胞单独发展来解释。

四亲体小鼠制备中操作要求严格。成功率常较低。引起失败的主要原因是选择的胚胎发

育不好,蛋白酶处理除透明带的时间过长引起对细胞的损伤。在机械推合中过粗及推在一起的胚胎在转运入孵箱过程中又分离。以及操作过程太长,洗涤中对胚胎的损伤等。此外,移植手术对成败关系亦很大。手术操作必需轻柔准确,送入胚胎的压力要适当,进入子宫的液体要少,穿刺子宫壁时要避免出血过多。根据经验在移植时加入一定CFI发育正常的囊胚期胚胎可使假孕雌鼠受孕率提高。植入的胚胎有时会出现难产情况(尤其是只有一只胚鼠时易发生),故对超过时间未分娩的雌鼠应剖腹取胎。

用胚胎融合技术所得异表型小鼠可作为研究胚胎发育、遗传变异等方面的动物模型,此外在免疫学研究中也有其特殊价值,如对免疫耐受性的研究^[4-6],免疫细胞组成^[7],免疫反应中细胞间的协同作用^[8],Ir基因功能及对合成抗原的反应性^[9,10]等方面。尤其有趣的是根据四亲体小鼠周围血细胞在生长过程中两种基因型细胞比例的波动^[11]用于衰老过程的研究^[12]为遗传对寿命的影响的研究提供了理想

的动物模型。

参 考 文 献

- [1] Mintz, B. et al., 1973 *Dev. Biol.* 31:195.
- [2] Warner, C. M. et al., 1973 *J. Immunol.* 111: 1887.
- [3] Tarkowski, A. K., 1961, *Nature* 190: 857.
- [4] Mintz, B. et al., 1967, *Science* 158:1484.
- [5] Festenstein, H. et al., 1975, *J. Immunol.* 2:351.
- [6] von Boehmer, H. L. et al., 1975, *J. Exp. Med.* 141: 322.
- [7] Warner, C. M. et al., 1977, *Cell Immunol.* 30:216.
- [8] von Boehmer, H. L. et al., 1975, *J. Exp. Med.* 138: 734.
- [9] Warner, C. M. et al., 1977, *J. Exp. Med.* 145:766.
- [10] Warner, C. M. et al., 1976, *Immunogenetics* 3:337.
- [11] Warner, C. M. et al., 1977, *Differentiation* 9:11.
- [12] Warner, C. M. et al., 1985, *Exp. Gerontol.* 20:35.

电 泳 技 术 新 进 展

1985年9月10日至20日美国哥伦比亚大学人类遗传学和发育学系主任 Charles R. Cantor 教授及夫人应我所邀请在上海进行了访问讲学。在此期间共举行了五次讲座,并在脉冲梯度电场(Pulse Field Gradient 即 PEG)凝胶电泳训练班上示范了实验操作。讲座的主要内容为脉冲梯度电场凝胶电泳。这个方法是由 Schwartz 和 Cantor 设计发明的,能够分离染色体 DNA 大分子。到目前为止,已经分离了酵母及一些寄生虫的不同染色体 DNA 分子。并利用这个技术进行了基因定位工作及对基因组的结构组成和重排进行了研究。估计以后还可以应用到更高等的生物中去。为染色体 DNA 大分子的深入研究提供了手段。

PFG 主要是根据染色体 DNA 大分子在琼脂糖凝胶中的泳动的速率,途径不一而造成染色体 DNA 的分离。在一般电泳情况下, DNA 分子在凝胶中以单方向泳动,所以分辨率只能到 15-25 kb。Cantor 等人把电泳分为二个方向,并形成电场梯度,以脉冲形式间隔地进行二个方向的电泳,使 DNA 分子在凝胶中

不断地变换方向。同时,又根据其长度而造成迁移率的不同,而产生良好的分离效果。

在 Cantor 教授发明此法后不久,华盛顿大学医学院遗传系的 Carle 和 Olson 也发明了一种类似的电泳方法,称 OFAGE(即相互垂直交替电场凝胶电泳 Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis)。其原理类似 PFG 电泳,结果也差不多。最近,他们又设计了单维的周期性倒向电场电泳(EIGE)分离 DNA 大分子。这样简进了电泳装置,而可以达到类似的效果(Carle 和 Olson 未发表的手稿)。其原理也与 PFG 接近,只是把二个方向变为单方向交替电泳,脉冲时间也变为以一个方向为主,反方向为次,只取其 1/3 时间长度。

我们实验室最近利用 Cantor 教授所设计的 PFG 电泳技术分析不同酵母菌的染色体带型,发现不同酵母菌的相应染色体长度并不完全一样。并结合杂交技术对我们已经克隆的 PRO 3 基因进行了基因定位。

(姜伟东 朱怡文)