

体外培养细胞的显微注射

陆荣华 吴直江 陈瑞铭

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

借助玻璃微吸管进行体细胞显微注射技术是由 Graessmann(1968) 和 Liacumakos 等(1970) 发展起来。这种技术已成功地将 DNA、mRNA、tRNA 和蛋白质等显微注射进细胞内, 并研究其生物效应^[1]。

目前已经能将一个体外培养的体细胞作为“活试管”, 通过显微注射技术, 把 DNA 等生物大分子注射进细胞内来研究复杂的生物学现象。由于具有直观, 效率高, 可自控注入的部位(细胞核或细胞质)以及供体和受体用量经济等优点, 较之红细胞或蜡质体介导的技术有一定的优越性。

近年来, 我们为开展基因转移的研究, 摸索建立了体外培养细胞直接显微注射技术。并采用闭路电视连上电视录象系统, 对显微注射的过程和结果进行动态记录和电视显示。现将实验方法概略介绍于下。

一、显微注射仪器装置

显微注射仪器基本装置是由一台 Carl Zeiss jena 右手显微操作器, 一架 Olympus IMT 型倒置相差显微镜, 以及由本所工厂加工的底座联结而成。

二、微吸管的制备以及注射样品的灌载

(1) 微吸管的制备

微吸管由内径为 1 mm 左右的内含玻璃丝的玻璃毛细管组成。将毛细管割成 7 cm 长度, 以硫酸重铬酸钾洗液清洗, 继而先用流水冲洗, 然后用蒸馏水和纯酒精冲洗, 120℃ 干燥, 储存于密闭容器内备用。

我们采用垂直型微电极控制仪*来控制显微注射用微吸管。适当调整电流强度、通电时间和拉力强度, 即可获得满意的微吸管。制备的微吸管其顶端直径为 1 μm 或小于 1 μm。有时微吸管顶端过细或封闭, 可将其置于显微镜下与有机玻璃板碰撞, 使之扩口或开口。

(2) 注射样品的灌载

我们借助自己装置的显微操作器^[2], 将样品从微吸管末端灌入。灌载样品后的微吸管顶端朝下垂置放置片刻, 让其顶端的小气泡向上逸出, 样品靠微吸管内玻璃丝引达微吸管顶端。样品溶液需经 15,000 rpm 高速离心 15 分钟, 方可灌载, 以免残颗粒阻塞微吸管。

三、细胞的准备

实验所用的细胞有: 人体肝癌细胞系 BEL-7404, 培养液为 RPMI 1640, 含 10% 小牛血清; NIH 3T3, 培养液为 DMEM, 含 10% 小牛血清; 小鼠神经母细胞瘤 NBA 2, 培养液为 MEM, 含 10% 小牛血清。细胞接种在 5 cm 塑料培养皿底部或小盖玻璃片上。一般取接种后的第二天细胞供注射实验。为了寻找和追踪被注射的细胞, 我们也采用了 Graessmann 和 Graessmann(1976) 的方法^[3]; 盖玻片用金刚钻笔轻轻地划成 1 mm² 的小格, 细胞接种在这种盖片上, 即可定位及追踪。

四、显微注射

显微注射的操作在灭菌空调室内进行。将

戴信兰、吴立丹和张懋弧参加实验工作。

* 生理所生产。

长有细胞的盖玻片置于存有 Hanks 液或不加血清的培液的 5 cm 塑料培养皿内,在显微镜下物色好被注射的细胞并对准焦距。操纵显微操作器将显微注射微吸管移至显微镜视野正中央并使微吸管尖端置于细胞上方。然后,轻轻放下微吸管,微吸管尖端刺入细胞。此时,可看到注入的样品液体从刺入点流入并充满整个细胞,致使细胞体积明显增大(照片 1—2)。一旦细胞被注射,应立即举起微吸管,顺即以左手操纵培养皿,移动至下一个被注射的细胞,并继续注射。

显微注射微吸管是通过管道与注射器相连。管道内的液相压力传导系统的介质为石蜡油。在注射前,向前移动注射器针筒芯,使管道系统保持一定压力。在进行连续注射时,无需再转动注射器芯。微吸管尖端一旦刺入细胞,样品液体会自动射出。因此,微吸管切勿在细胞内滞留过久,否则,会因注入过多的样品而使细胞胀破。注射完毕后,更换培液,继续培养,检查结果。注射后细胞 70—80% 存活,继续培养的结果良好。

五、显微注射的动态记录和电视显示

细胞显微注射是在相差显微镜下进行的。为了能进行动态记录,连上闭路电视录象系统。

细胞微量注射的对象是活细胞,因而不能染色。尽管是在相差显微镜下操作,细胞图象的反差仍然是比较低的。要摄取这样的显微图象,对电视摄象机就有一定的要求,即灵敏度要求较高,有足够的对比度。为此,我们采用硒化镉摄象管,管子的极限照度在 1 LX 左右。

图 1 所示的为闭路电视的基本框图,主要由摄象管、预放大器、视频通道和场行扫描几部分组成。被摄取的细胞光学图象通过显微镜在摄象管的靶面上成象,摄象管输出一个与光象相对应的电视图象信号电流。信号电流先由预放大器作低噪声前置放大。预放大器输出的电视图象信号是比较粗糙的,必须再由视频通道处理加工,形成全电视信号。最后,在电视监视器的

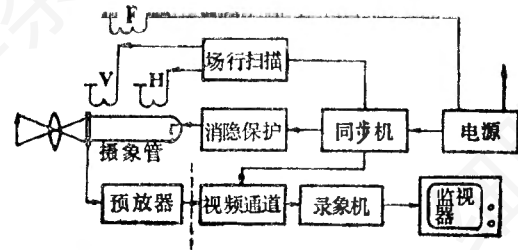


图 1 闭路电视系统的基本框图

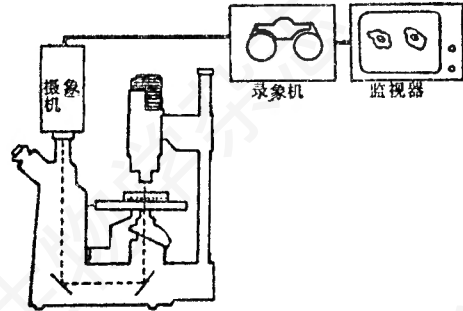


图 2 细胞显微注射观察与记录实验装置

荧光屏上显示出稳定、清晰、逼真的细胞图象。

实验装置采用 JX-117 摄象机及本所研制的 84 型微光增强显微电视的高分辨率监视器,录象机是用索尼 2630 型 3/4 吋的机器。对于一般的显微镜或相差显微镜,如无特殊设计的电视摄象光路,则可将摄象管的靶面置于显微镜照相光路相当于底片的位置上。整个装置连接如图 2 所示。

要对细胞作动态实验记录时,细胞图象由摄象机摄取,然后由录象机将全电视信号记录在录象带上。如要反复观察,仔细研究,可以使用录象机的重放系统,因此细胞图象可以在电视荧光屏上作重复的动态显示,使用十分方便灵活(照片 3—6)。

参 考 文 献

- [1] Celis J. E. et, al., 1980, Microinjection of somatic cells in Introduction of macromolecules into viable manomalian cells, eds. Baserga, R. Ital. Alan R. hiss, Inc. New York P 99—123.
- [2] 陆荣华, 陈瑞铭, 1977, 生物化学与生物物理进展 4. P.
- [3] Graessmann, M. and Graessmann, A., 1976, Proc Natl. Acad. Sci., 73: 366.