

# 表面张力辅助去核法对小鼠卵母细胞的去核研究

孟庆刚, 朱士恩, 曾申明, 张忠诚

(中国农业大学动物科技学院胚胎生物技术实验室, 北京 100094)

**[摘要]** 论述了一种新的小鼠卵母细胞去核方法——表面张力辅助去核法(STA),并同时与其他3种去核方法(简称A法、B法、C法)进行比较。STA法是将卵母细胞核在固定管的辅助下,借助液体表面张力通过透明带上的破口被挤出。经STA法去核的卵母细胞质体用于电融合介导的小鼠耳成纤维细胞核移植实验,结果有76.1%细胞与细胞质体融合形成重组胚,85.4%的重组胚形成原核,49.4%卵裂形成2-细胞。

**[关键词]** 表面张力辅助;去核;卵母细胞;小鼠

动物体细胞核移植技术虽然在绵羊<sup>[1,2]</sup>、牛<sup>[3]</sup>、猪<sup>[4]</sup>和小鼠<sup>[5]</sup>上取得了很大进展,但体细胞克隆技术的效率还未超过10%,许多环节需要改进。卵母细胞去核是细胞核移植中的重要步骤,一种快速、准确的去核方法将无疑会提高核移植技术的整体效率。

小鼠是一种最为常用的实验动物。最早的胚胎细胞核移植后代是在小鼠上获得的<sup>[6]</sup>。但小鼠卵母细胞的特性与家畜(牛、羊和猪)差异很大。小鼠卵母细胞的直径相对较小,透明带薄而软。这种特性使小鼠卵母细胞在显微操作时难度增大。在家畜卵母细胞去核中应用的显微针管(直径约20~25 $\mu\text{m}$ )对于小鼠卵母细胞显然太粗。为解决这一问题,在去核中可使用一细的显微针管(直径约10 $\mu\text{m}$ )。这种方法很有效率,但需要昂贵的电脉冲驱动设备,而且,这种针管也不能吸出极体。极体的存在将影响供体细胞和细胞质体的电融合。本实验将介绍一种新的简单的小鼠卵母细胞去核方法,即表面张力辅助去核法(STA)。

## 1 材料与方 法

### 1.1 显微操作工具的制作

在STA法的研究试验中,选用了其他3种方法——A法、B法、C法作对比试验。

STA法显微操作工具的制作:固定管先以手工控制,然后在微煨烧仪(CIT Alcatel, France)上拉成外径约90 $\mu\text{m}$ ,内径约为20 $\mu\text{m}$ 的微管;去核针用毛细玻璃管在拉针仪(PN-30, NARISHIGA, Japan)上拉制成细部长约0.8mm,末端有尖的玻璃针。

作为比较,另拉制以下操作工具:外径25 $\mu\text{m}$ 的平口管(A法用);外径25 $\mu\text{m}$ 末端用磨针仪(NARISHIGA, Japan)磨成45°角并拉尖的斜口管(B法用);与B法相似,但外径10 $\mu\text{m}$ 末端拉尖的斜口管用于C法。

### 1.2 卵母细胞的收集

超数排卵:7~12周龄的雌性昆明白系小鼠,隔日腹腔注射PMSG和hCG(宁波激素制品厂各10IU/只。于hCG注射后13~14h,收集卵丘卵母细胞复合体(COCs),COCs移入含有0.1%透明质酸酶的HEPES-CZB中,在37℃的恒温台上处理3~5min,脱除卵母细胞周围的卵丘细胞,脱除卵丘细胞后的卵母细胞即用于去核操作。

### 1.3 表面张力辅助去核(STA)

**[收稿日期]** 2001-08-06;修回日期 2001-09-05

**[基金项目]** 国家“九五”攻关项目(96-A23-06-05)

**[作者简介]** 孟庆刚(1971-),男,黑龙江克山县人,中国农业大学博士研究生

去核显微操作是在  $\phi 35$  mm 培养皿的盖中进行的, 一滴约  $40 \mu\text{L}$  的含  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  细胞松弛素 CB HEPES-CZB 用作去核的操作滴。操作滴上覆盖石蜡油后置于装备有显微操作系统的倒置显微镜的载物台上。首先将一组 (10~15 枚) 小鼠卵母细胞移入操作滴并停留 10 min, 当显微镜放大 200 倍时, 可以看到细胞核区呈半透明状。细胞核的去除: 在固定管的协助下, 调整卵母细胞的位置, 使细胞核处于时钟 12 的位置 (图 1-A)。用微针在

细胞核上方的透明带上穿刺 (图 1-B), 然后使微针在固定管上往复摩擦, 使核上方形成一个破口 (图 1-C)。重新吸住卵母细胞使破口处于时钟 3 的位置 (图 1-D)。移动载物台, 使溶液的边缘缓慢向卵母细胞靠近, 在卵母细胞接近溶液边缘移动的过程中, 细胞核可以被表面张力挤出透明带 (图 1-E)。退下固定管后透明带封闭, 将核质体和卵母细胞分开。

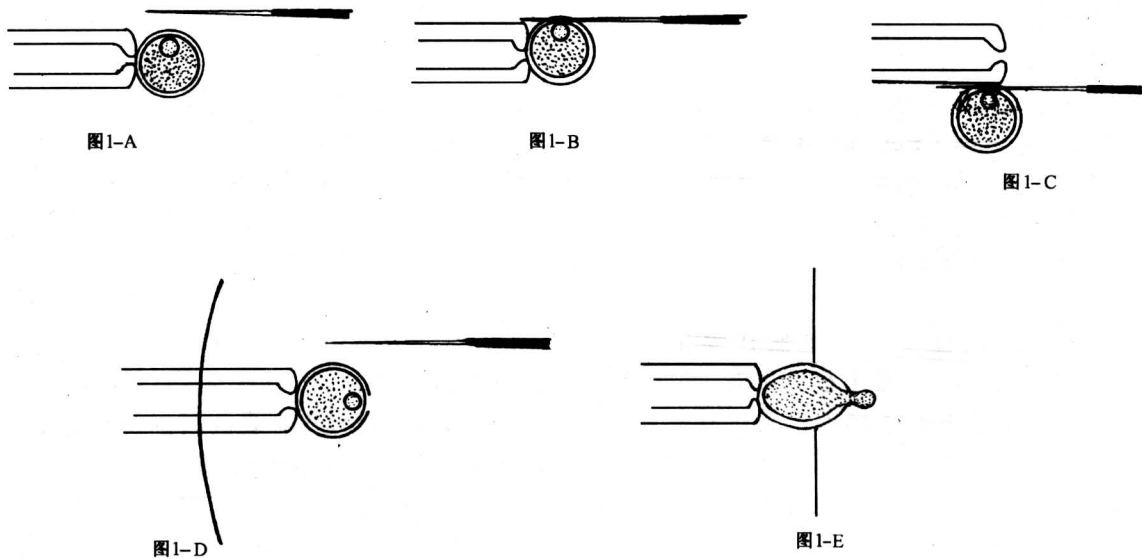


图 1 (A-E) 小鼠卵母细胞表面张力辅助法去核示意图

Fig.1 (A-E). Oocyte enucleating with surface tension assisted method in mouse

#### 1.4 其他几种去核方法

方法 A 参考王敏康的方法<sup>[7]</sup>, 但卵母细胞不在含有蔗糖的溶液预处理。将细胞核如 A 法定位后, 用微针在细胞核上方的透明带上穿刺、开口, 用外径  $25 \mu\text{m}$  的平口去核管从透明带的开口进入吸出核质体。B 法<sup>[8]</sup>将细胞核如上述方法定位后, 以外径  $10 \mu\text{m}$  的斜口去核管直接刺破透明带, 吸出核质体。C 法<sup>[9]</sup>不进行细胞核的定位, 而选取有明显第一极体的卵母细胞, 进行去核, 用外径  $25 \mu\text{m}$  的斜口去核管直接刺破透明带, 吸出第一极体及其下约  $1/3$  的细胞质。

为避免第一极体的存在影响供体细胞和受体胞质的融合, 采用以下方法处理卵母细胞: a. 带有已经退化的极体卵母细胞去核后直接用于核移植实验; b. 细胞核紧邻第一极体, 在第一极体上方的透明带上开口, 用表面张力先挤出第一极体, 再挤出其下

的细胞核; c. 细胞核与第一极体的夹角小于  $90^\circ$ , 在细胞核和第一极体上方的透明带上各开一小口, 先用表面张力挤出第一极体, 再调整卵母细胞的位置, 挤出细胞核。细胞核与第一极体的夹角大于  $90^\circ$ , 这部分卵母细胞不用于核移植实验。

#### 1.5 去核效率的检验

测量每组去核得到的核质体的直径, 计算平均值, 并根据球体的体积公式:  $v = 4/3\pi r^3$  ( $r$  为核质体球体半径) 计算其占卵母细胞体积的比例, 以此作为去核时的胞质损失率。记录每组去核操作的时间, 计算操作每枚卵母细胞的平均时间。一部分核质体, 用含有  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  Hoechst33342 染色剂的 CZB 溶液处理 15 min, 在荧光显微镜下观察, 根据观察到的含有 DNA 的核质体数占去核卵母细胞数的比例, 计算去核的准确率。

#### 1.6 核供体细胞的准备

成纤维细胞的培养参考 Ogura 等<sup>[10]</sup>的方法进行。将 3~4 块 3~4 mm<sup>2</sup> 雄性 C57 小鼠的耳廓组织贴于  $\phi$ 35 mm 培养皿的底面, 每个培养皿贴 3~4 块。在空气中自然干燥 1 h 后, 加入约 3 mL DMEM/F12 培养液 (含 10 % 胎牛血清, 100  $\mu$ g/mL 和 100  $\mu$ g/mL 青、链霉素)。在 37  $^{\circ}$ C、5 % CO<sub>2</sub> 和 100 % 湿度的二氧化碳培养箱中培养 7~8 d。每隔 2 d 更换一次培养液。待成纤维细胞汇合成片占 80 % 的底面时进行传代培养。采用体外传代培养第 7 代的细胞作为细胞核供体。

### 1.7 细胞核移植 (克隆)

以 STA 法去核的卵母细胞应用于克隆实验。用 25  $\mu$ m 的注射微管将一个直径 15~20  $\mu$ m 的成纤维细胞通过透明带上的豁口, 移入到去核卵母细胞的卵周隙。使用的融合仪 (KEFA450, 中国) 在 0.3 mol/L 的甘露醇 (加 1 mg/mL 的 BSA) 的融合液中, 以交流 10 V, 1.5 MHz 作用 6~8 s, 再以直流 1 400 V/cm, 10  $\mu$ s 电刺激一次, 然后移入含有 10 mol/L 牛磺酸 CZB 中, 置于二氧化碳培

养箱中培养。40 min 后未融合的再次给予相同条件的处理。

### 1.8 孤雌激活和胚胎培养

受体卵胞质和核供体细胞, 在融合后 1~2 h, 以含有 5  $\mu$ g/mL 的激活液 (10 mol/L 的 SrCl<sub>2</sub>-CZB) 中处理 3 h; 移入含有 5  $\mu$ g/mL CB 的 CZB 中继续培养 5 h, 最后转入含 10 mol/L 牛磺酸的 CZB 中培养。

## 2 结果

### 2.1 几种去核效果的比较

a. 在操作时间上, A 法的操作时间 (3 min/枚) 显著长于 STA (1.33 min/枚)、B (1.30 min/枚) 和 C 法 (1.41 min/枚), 后三种方法没有显著差异; b. 在去核的细胞质损失量上, C 法造成的细胞质损失达 28.4 %, 显著高于其它三种方法 (5 %); c. 在去核的准确率上, C 法 (35.3 %) 显著低于其它三法 (95 % 以上) (表 1)。STA 法去除的细胞核见图 (见图 2、图 3)。

表 1 小鼠卵母细胞几种去核方法效果的比较

Table 1 Comparison of the enucleating methods in mouse

方法	卵母细胞数	去核效率			
		时间/min	核质体直径/ $\mu$ m	胞质损失量/%	准确率/%
STA 法	88	1.33 <sup>a</sup>	29.5 $\pm$ 4.32 <sup>a</sup>	5.01 <sup>a</sup>	85/88 (96.6) <sup>a</sup>
A 法	75	3.12 <sup>b</sup>	28.6 $\pm$ 4.23 <sup>a</sup>	4.57 <sup>a</sup>	72/75 (96.0) <sup>a</sup>
B 法	79	1.30 <sup>a</sup>	28.4 $\pm$ 5.36 <sup>a</sup>	4.47 <sup>a</sup>	76/79 (96.2) <sup>a</sup>
C 法	68	1.41 <sup>a</sup>	52.6 $\pm$ 12.83 <sup>b</sup>	28.4 <sup>b</sup>	24/68 (35.3) <sup>b</sup>

注: a, b, 差异显著 ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 克隆效果

实验共移植 234 枚小鼠耳成纤维细胞到去核卵母细胞质的卵周隙中, 经电融合处理, 共融合 178 枚 (76.1 %), 有 152 枚 (85.4 %) 融合后的重组胚形成原核。其中有 88 枚 (49.4 %) 重组胚卵裂, 并形成 2-细胞。

## 3 讨论

去核效率的提高将是提高核移植技术整体效率的重要环节。一种好的去核技术应准确、简单、快速, 减少对卵母细胞的刺激, 并保证尽量减少去核造成的细胞质损失。在大动物, 几乎所有克隆成功者都是以电融合介导的核移植技术生产的。尽管已

经有了几例克隆小鼠成功的报道, 但在去核方法上仍有待改进。在一些报道中<sup>[6,10]</sup>, 去核需要一根细的 (直径约 7  $\mu$ m) 针管和电脉冲驱动, 这种针可以很容易地刺穿透明带并吸出细胞核, 但这种设备是昂贵的。在其他的报道<sup>[8]</sup>中, 研究者使用一细的无电脉冲驱动的微针 (外径约 10  $\mu$ m) 吸出细胞核。然而, 上述两种去核方法中使用的微针都无法吸出未退化的第一极体 (直径约 20  $\mu$ m)。由于极体的直径与体外培养的体细胞的直径很接近, 如果用电脉冲介导体细胞与卵母细胞质融合, 第一极体的存在将会干扰融合效果。可见, 目前多数实验中应用的去核方法将核移植的方法局限为直接注射法。目前, 只有一例克隆小鼠是通过电融合介导的

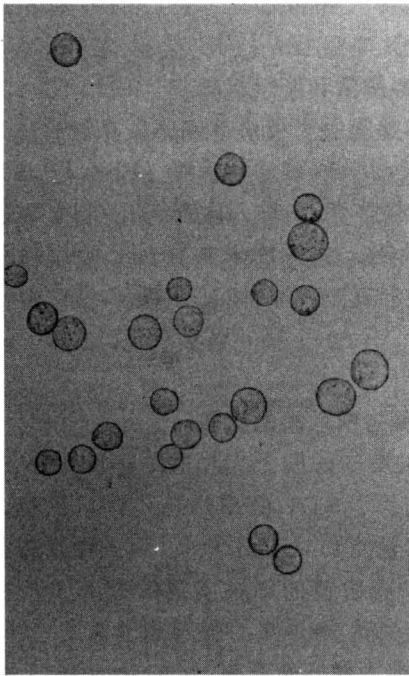


图2 普通显微镜下观察到的 STA 法去除的细胞核质体

Fig. 2 Karyoplasts obtained with STA method under common microscope

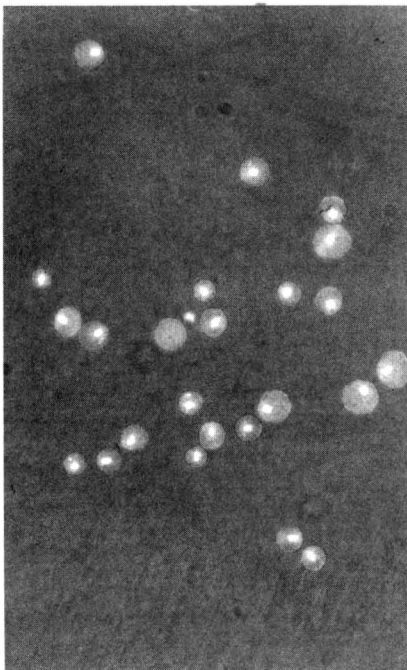


图3 经 Hoechst33342 染色后在荧光显微镜下观察到的发光的细胞核

Fig. 3 Karyoplasts dyed with Hoechst33342 glowed under fluorescent microscope

方式核移植成功的<sup>[10]</sup>。有报道用化学去核法去除小鼠卵母细胞核<sup>[11]</sup>。这是一种很有诱惑力的方法,但其准确率(54%)<sup>[11]</sup>很低。因此,这种方法依然需要荧光染色来选出去核的卵母细胞。另外,化学法去核后,卵母细胞的核质体排出到卵周隙中,所以这种去核的卵母细胞只能应用直接注射的方法进行核移植,且不能应用电融合介导的核移植。在本实验中,使用表面张力辅助的方法可去除多数小鼠卵母细胞的细胞核和第一极体。因此,这种去核的小鼠卵母细胞可应用于电融合介导的细胞核移植。

多数研究表明<sup>[5,10]</sup>,小鼠卵母细胞核在放大200倍时呈半透明区。这样在去核之前可以定位细胞核的位置,这就保证了去核的高准确率。在操作液中添加3%蔗糖,即使在普通的显微镜下也可以显示出小鼠细胞核的位置<sup>[7]</sup>。Kono<sup>[12]</sup>(1991年)发现只有10%的卵母细胞的细胞核紧靠第一极体。本实验中发现hCG注射后13~14h取卵母细胞,大约只有25%的卵母细胞的细胞核紧靠第一极体之下。王敏康<sup>[7]</sup>(2000年)证实小鼠卵母细胞的细胞核与第一极体的位置无紧密关系。说明小鼠卵母细胞在第一极体排出后,多数第一极体发生了位置迁移。这种情况下,以第一极体为参照物,就很难定位细胞核的位置。这也是本实验中C法<sup>[9]</sup>去核准确率低的原因。谭景和等<sup>[13]</sup>(1993年)用C法去核,发现吸取第一极体下1/4和1/3的细胞质只能获得49%和54%的去核成功率。

有研究表明,在去核过程中尽量减少细胞质的损失,有益于提高核移植重组胚的囊胚发育率<sup>[14]</sup>;而在去核过程中受体细胞质损失量的增加,会显著降低核移植重组胚的囊胚细胞数<sup>[15]</sup>。本研究使用的表面张力辅助去核法(STA)在去核时只损失约5%的细胞质,与在去核时造成约30%细胞质损失的C法相比,对重组胚以后的发育更加有利。

本实验中,A法的操作时间显著长于STA、B和C法。这主要是因为A法在去核的过程中需要更换微针,并需要两次定位细胞核的位置。值得一提的是,STA法去核的过程非常简单,这就使得其操作时间显著少于A法。

溶液的表面张力不仅可以在小鼠卵母细胞的去核中应用,在其他的显微操作中也可广为利用。有研究表明,小鼠的第一极体和第二极体含有完整的遗传物质,可用作生产有生殖能力的后代<sup>[16~18]</sup>。

本实验结果表明, 表面张力辅助法可简单地将极体从卵母细胞中去除, 可用于第一和第二极体的研究。在核移植实验中, 85.4% 的核移植重组胚可发育形成原核, 近 50% 发育到 2-细胞阶段。这个结果也表明表面张力辅助去核方法的有效性。

#### 参考文献

- [1] Campbell K H S, McWhir J, Ritchie W A, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line[J]. *Nature*, 1996, 380:64~66
- [2] Wilmut I, Schnleke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Nature*, 1997, 385:810~813
- [3] Cibelli B J, Stice S L, Golueke P L, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts[J]. *Science*, 1998, 280:1256~1258
- [4] Polejaeva I, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. *Nature*, 2000, 407:505~509
- [5] Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. *Nature*, 1998, 394(23): 369~374
- [6] Illmensee K, and Hoppe P C. Nuclear transplantation in the mouse musculus: Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos[J]. *Cell*, 1981, 23:9~18
- [7] 王敏康. 小鼠克隆及核质关系的研究[D]. 中国农业大学博士学位论文, 2000
- [8] Zhou Q, Boulanger L, Renard J P. A simplified method for the reconstruction of fully competent mouse zygotes from adult somatic donor nuclei[J]. *Cloning*, 2000, 2(1):35~44
- [9] McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion[J]. *Science*, 1983, 220:1300~1302
- [10] Ogura A, Inoue K, Takano K, et al. Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells[J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, 57:55~59
- [11] Baguisi A, Overstrom E W. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals[J]. *Theriogenology*, 2000, 53(1): 209
- [12] Kono T, Kwon O Y, Nakahara T. Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei[J]. *J Reprod Fertil*, 1991, 93:165~172
- [13] 谭景和, 徐立滨, 吴光明, 等. 小鼠卵母细胞去核方法的研究[J]. *东北农学院学报*, 1993, 24(3):237~244
- [14] Zakhartcheonko V, Stojkovic M, Palma G, et al. Enucleation of bovine oocytes with minimal cytoplasmic volume: effect on development of nuclear transfer embryos[J]. *Theriogenology*, 1997, 47(1):238
- [15] Westhusin M E, Collas P, Marek D, et al. Reducing the amount of cytoplasm available for early embryonic development decreases the quality fertilization and nuclear transplantation[J]. *Theriogenology*, 1996, 46:243~252
- [16] Wakayama T, Hayashi Y, Ogura A. Participation of the female pronucleus derived from the second polar body in full embryonic development of mice[J]. *J Reprod Fertil*, 1997, 110:263~266
- [17] Wakayama T, Yanagimachi R. The first polar body can be used for the production of normal offspring in mice[J]. *Biol Reprod*, 1998, 59:100~104
- [18] 范必勤. 哺乳动物第一和第二极体的研究[J]. *农业生物技术学报*, 2000, 8(2):103~105

## Mouse Oocyte Enucleation with Surface Tension Assisted Method

Meng Qinggang, Zhu Shien, Zeng Shenming, Zhang Zhongcheng

(*Lab of Animal Embryonic Biotechnology, College of Animal Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China*)

[Abstract] In the present experiment a new simple method-Surface Tension Aided (STA)- for mouse oocyte enucleation is employed and is compared with three other ones. In method STA, the chromosome spindle was

(cont. on p. 79)



其横向最大位移大于等直径扬矿管。在扬矿管的设计中,我们推荐使用阶梯式扬矿管。

#### 参考文献

- [ 1 ] 刘 江. 大洋采矿扬矿管强度分析及动态特性研究 [D]. 北京: 北京科技大学资源工程学院, 1997
- [ 2 ] Chung J S. Hydrodynamic forces on marine riser; A velocity-potential method[J]. *Journal of Energy Resources Technology*, 1982, 104(3): 53
- [ 3 ] Chung J S, Felippa C A. Nonlinear transient motion of deep ocean mining pipe[J]. *Journal of Energy Resources Technology*, 1981, 103(3):9
- [ 4 ] 蒋友谅. 非线性有限元法[M]. 北京:北京工业学院出版社,1988
- [ 5 ] 郑兆昌. 机械振动[M]. 北京:机械工业出版社,1982
- [ 6 ] 贝斯 K J. ADINA/ADINAT 使用手册[M]. 赵兴华译. 北京: 机械工业出版社, 1986

## Dynamic Analysis for the Lateral Movement of a Lifting Pipe in Deep Sea Mining

Liu Jiang Mao Jiling Liu Beiyong Ling Sheng

(UST Beijing, Beijing 100083, China)

[Abstract] Dynamic analysis for the lateral movement of a lifting pipe in deep sea mining is made by using nonlinear finite element method. The factors influencing the dynamic stress and deformation of the lifting pipe are analyzed in detail by means of ADINA. A new concept of 'displacement delaying time' is put forward and related influencing factors are also discussed. The results obtained are of great importance to the design and operation of the lifting pipe.

[Key words] deep sea mining; lifting pipe; dynamic stress; displacement delaying time; nonlinear finite element method

(cont. from p. 69)

squeezed out by the surface tension of the drop edge with the help of micropipette through a slit made in advance in zona pellucida. In method A, the nucleus was aspirated out through a plat end, 25  $\mu\text{m}$  micropipette via the slit. In method B, the nucleus was aspirated out through a 10 $\mu\text{m}$  micropipette directly. In method C, the nucleus was assumed just under the first polar body and the enucleating procedure was carried out by aspirated one third of cytoplasm beneath the polarbody. The manipulation time in method A (3 min/oocyte) was significantly longer than that in method STA (1.33min/oocyte), method B (1.30 min/oocyte) and method C (1.41 min/oocyte); The cytoplasm loss in method C (28.4 %) was significantly higher than those in the other three methods. In methods STA, A and B, very small amount (approximately 5 %) of cytoplasm was lost. The accuracy rate of method C (35.3 %) was significantly lower than those in the other three methods, the accuracy rate of method STA, A and B was above 95 % and there is no significant differences among these methods. Some of the cytoplasts produced by STA were used for mouse ear fibroblast cell nuclear transfer by electrofusion. Majority (76.1 %) of the cell-cytoplast pairs fused to form reconstructed embryos, 85.4 % of reconstituted embryos developed to form pronuclei and 49.4 % of them clove to form 2-cell embryos.

[Key words] surface tension assisted;enucleation;oocyte; mouse