

# 鱼类细胞核移植技术

中国科学院北京动物研究所细胞室

细胞核移植是一种在解剖显微镜或显微镜下进行操作的精细技术。主要是利用它来研究胚胎发育过程中,细胞中的细胞核和细胞质的功能,以及二者之间的相互关系,探讨有关遗传、发育和细胞分化等方面的一

些基本理论问题。

我们曾在金鱼和鳊鱼胚胎细胞的移核试验中曾发现,经过移核后的杂交胚胎或幼鱼会出现类似于该二种鱼有性杂交所得子代的杂种性状。最近又在鲤科

经济鱼类中进行试验,并获得了种间核移植成功的幼鱼。看来这种方法对于研究经济鱼类的杂交品种培育问题,也许能提供一种新的试验途径。现以鱼类胚胎细胞核的移植为例,将试验中所需器材的制作方法(全部可以自制),和移植细胞核的基本操作技术,作一简介。

### 一、电热式拉针器和玻璃微型吸管、微针的制作

1. 电热式拉针器的制作 绕制一个初级输入电压为 220 伏,次级输出电压为 0—8 伏,输出电流为 0—6 安的交流调压变压器(参考数据:用铁心截面为 4 厘米×3 厘米的“E1”型硅钢片为变压器铁心。初级线圈用直径 0.4 毫米的漆包铜线绕 8 层,每层 115 匝,共 920 匝;次级线圈用直径 1.3—1.5 毫米的漆包铜线绕一层共 30 匝左右,次级输出做成滑动调变式)。在输出的二端联上一个用直径为 0.5—0.8 毫米的镍铬丝密绕 4—5 圈而成的加热丝圈(圈径约为 4 毫米),把它装在一个垂直铁支架上面的一块绝缘板上,再加上一块能使此板作上下、左右、前后三种方向活动的三维机械调节装置,就制成了一个简单的电热式重力拉针器(图 1)\*。使用时可调节变压器输出端的电压控制加热丝圈的热量。一般调到 4—5 伏时,加热丝圈的热量较适宜。

2. 玻璃微型吸管和微针的制作 移植细胞核必须用口径非常细的微型吸管,供单个细胞的吸取和移植之用。其制作过程为:先准备直径约 10 毫米,壁厚约 2 毫米的软质玻璃管,截成约 30 厘米的长度。经肥皂水、洗液和大量流水冲净,再用蒸馏水洗过、凉干或烤干后,先在喷灯上拉制成直径约 2 毫米,壁厚约 0.05 毫米,长约 30 厘米的薄壁毛细管,并用火焰把二端封闭备用,这样可使毛细管在贮存时保持洁净。拉微型吸管时,可截取一段长约 10 厘米的毛细管,将其一端垂直固定在电热拉针器上端的支架上,并使毛细管通过加热丝圈的中心,这一位置可用架上的三维机械调节装置来调节,以使毛细管的四周受热均匀。在毛细管向地的一端夹上一个重锤,锤重为 100—200 克(在重锤下落处置一棉花盘以接住下落之重锤和微型吸管,以免损坏桌子或吸管)。然后接上拉针器电源,加热丝圈即发热变红,使毛细管软化并随重锤的下落,自然折断而成微型吸管(口径以 20—40 微米者较合用)。制成之吸管用高温灭菌。

挑卵细胞核时需用玻璃微针,可用 5 毫米的软质玻璃棒按上述同样的方法制作。微针尖一般为 2—4 微米,要求尖锐而有力。

### 二、移植细胞核用的显微注射器和操纵台

1. 显微注射器 微型吸管要装在显微注射器上才能使用。国产的微量注射器(中国科医文化厂出品)很适用于此一目的。它是由一个外径为 8 毫米的小型玻璃注射器,一个已去掉尺架的 25 毫米外径千分尺和一个连接此二者的金属半筒套所组成。在玻璃注射器

的筒心上套一段长约 30 毫米,直径稍大于筒心的钢丝弹簧(用直径约 0.8 毫米的钢丝绕成)。当向前或向后旋转千分尺上的微分筒时,即可借此弹簧的弹力,作向内吸和向外注射的动作。在注射器的注射孔处套一段长约 2 厘米的橡皮导尿管和一小段毛细管作为接管,再引连一根外径为 2.5 毫米,长约 30 厘米的医用塑料动脉导管,在此塑料管的末端再套一小段毛细管和一段橡皮导尿管作为微型吸管的接口。在微型吸管接口以上的塑料管外面套一根细玻璃管作为支持管,以便夹在操纵器的铁夹上。从玻璃注射器到微型吸管的整个导管的各接口处,都用石蜡或胶封好,使整个导管保持密闭。使用前在注射器和导管内充满生理盐水,液面可达到微型吸管的一半,这样只要轻轻旋转千分尺上的微分筒,即可观察到管内液面的前后移动,以控制管内压力的变化。如装液时不慎使管内吸入气泡,必须设法排除或重装溶液以免影响显微注射器的灵敏度。经过这样校正后,即做成一个很灵敏的液压式显微注射器(图 2)。如果没有上述成品,也可用一支 1 毫升或 0.5 毫升的链霉素注射器和一个去掉尺架的 25 毫米外径千分尺,自制一个连接二者用的金属半筒套即可配制成同样适用的显微注射器。

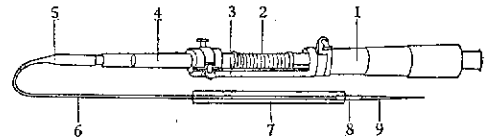


图 2. 显微注射器简图

1. 外径千分尺, 2. 钢丝弹簧, 3. 金属半筒套, 4. 玻璃注射器, 5. 导尿管和毛细管接管, 6. 塑料动脉导管, 7. 玻璃管, 8. 毛细管和导尿管接口, 9. 微型吸管

2. 操纵台 取普通显微镜上所用的载片移动台(广州光学仪器厂出品)一个,在其横轴上位于左侧的夹片卡的游离端处用螺丝固定一只铁夹。另外准备 20 厘米×10 厘米×1.5 厘米的铁板一块,板下四角装上橡皮垫脚,以便使它能平稳地放在工作台上,在板上左方的一角处装一根 1 厘米×2 厘米×10 厘米的长方形铁柱,把上述移动台用螺丝以垂直的方式固定在铁柱上。在铁板上靠右方再装一根直径约 1.2 厘米,高约 10 厘米的铁柱。用一个双头夹把上述显微注射器以水平方向和与移动台平行的位置固定在此柱上,并把注射器前端的玻璃支持管,斜向地夹住在移动台上的铁夹内,这样就构成了一套简易的细胞核移植操纵台(图 3)\*。调节铁夹的角度,就能调节微型吸管的斜度,同时旋转移动台上的二个位移旋钮,即可使微型吸管作上下,左右方向的移动。这样就能在解剖显微

\* 本文图 1,3 放在封二。

镜下把微型吸管对准所需吸取或注射的细胞。

### 三、移植鱼类胚胎细胞核的技术

1. 实验用具 准备一些直径为6厘米左右的平底圆培养皿,灭菌消毒。取其中一部分用煮沸的1.5%的冻粉液浇在皿底,冷却后备用。剥膜后的裸卵放在盛有溶液的此皿内就不会与皿底相粘,而且当卵子在冻粉层上被拨动时,也不易损伤。准备二把以上精磨得很尖的不锈钢钟表镊;用初生婴儿的细胞发,弯曲成直径为1—2毫米的瓣状,用石蜡装固在一支玻璃毛细管的尖端,做成一个可用来轻轻拨动或压住卵子,而不会使它受伤的柔软发圈(图4)。再准备几支口径约1.5毫米和0.1毫米的玻璃吸管,准备吸鱼卵和其囊胚细胞用。这些工具在使用前均用酒精消毒。

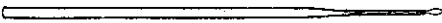


图4. 发圈简图

2. 实验用消毒水、培养液和细胞分离液 消毒水一般用煮沸的开水。移植细胞核时用的卵子培养液用郝氏(Holtfreter)液( $\text{NaCl}$  0.35克,  $\text{KCl}$  0.005克,  $\text{CaCl}_2$  0.01克溶于100毫升玻璃重蒸水内煮沸,冷却后再加  $\text{NaHCO}_3$  0.02克, pH 7左右)移植后卵子和胚胎的培养液用1/10的郝氏液。囊胚细胞的分离液用缺钙的郝氏液加入乙二胺四乙酸二钠盐配制而成( $\text{NaCl}$  0.35克,  $\text{KCl}$  0.005克,  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.055克溶于100毫升玻璃重蒸水内煮沸,冷却后再加  $\text{NaHCO}_3$  0.02克, pH 7左右)。

3. 鱼卵的剥膜、挑细胞核和移植细胞核 取成熟而正待排卵的雌鱼(金鱼、鲫鱼、鲤鱼、鳊鱼、青鱼、草鱼、鲢鱼、鳙鱼等均可),用清洁水洗净其泄殖腔处,并用毛巾擦干,用手轻压其腹部,挤出成熟的卵子置于盛有消毒水的培养皿内,同时轻轻摇动培养皿,这样可使粘性卵均匀地粘着在皿底,也可使浮性卵均匀地分散。将培养皿移置于25倍,广视野,长工作距离的解剖显微镜(云南光学仪器厂出品)下观察,2—3分钟后即见卵膜吸水膨胀,卵子与卵膜间出现逐渐扩大的卵周隙,此时即可用磨尖的钟表镊,在解剖显微镜下剥开卵膜,游离出卵子。在剥粘性卵时,一般只需一手持镊,用镊尖夹住卵膜的一处,迅速把膜撕裂(图5a),裂口越大越好,这样可使卵子从容脱出。撕膜的起点,最好选在靠近卵膜与皿底相粘处,因此处卵膜较固定,容易被撕裂,而不致牵动膜内的卵子,使它从裂缝处挤出而损坏。在剥浮性卵的卵膜时,因为它们的卵膜吸水后要胀大很多倍,卵周隙很大,所以可用双手持镊,同时夹住卵膜上的一处,迅速把卵膜向外撕裂(图5b),卵子即脱膜而出,一般不会损伤卵子。各种鱼卵的外膜性质不一样,所以剥膜的难易也不同,一般在10分钟内可剥卵膜20—30个。

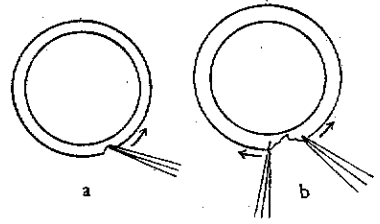


图5 a. 用单镊剥粘性卵膜 b. 用双镊剥浮性卵膜

用消毒过的吸管将去膜后的卵移至底上涂有冻粉层的培养皿内,皿内盛有郝氏液。用左手持发圈一边轻轻拨动卵子,一边仔细观察,当卵子被拨到侧面时,即可在其动物性极紧靠胚盘中心处,看到一个透亮而很小的极体(约10微米)。紧靠此极体的胚盘表面下,就是它的卵核(这在把卵子切片后观察,可以看到此核)。此时用发圈轻轻压住卵子,同时用右手持一玻璃微针,在极体的紧旁刺入卵内(图6a),再往外一挑,卵

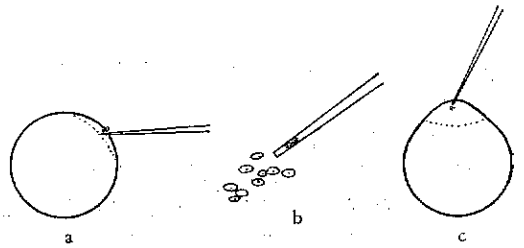


图6 a. 用玻璃微针挑鱼卵的细胞核 b. 吸入微型吸管内的鱼囊胚细胞 c. 移入细胞核时,微型吸管刺入未受精去核鱼卵胚盘内的位置

核即与少许细胞质一同流出,挑核处的伤口在郝氏液内很快愈合,此卵即可作为移入另一个细胞核的受体。有些卵子因脱膜后时间太久,或经发圈反复拨弄,已使极体脱落,看不准挑细胞核的位置,则应弃之不用。

取另一种受精后已发育到高囊胚或低囊胚的鱼卵(在25℃下,金鱼、鲫、鲤等卵在受精后4—5小时;家鱼卵为受精后3—4小时)去膜后,置于底上涂有冻粉,并盛有细胞分离液的培养皿内,置于解剖显微镜下,用玻璃针切下位于动物性极的囊胚细胞团,这些细胞在2—3分钟内就能分散成单个的游离细胞,大小在30—50微米之间。如果细胞暂时分散不开,可用一支细吸管吸水后轻轻冲击它们,即可帮助细胞快些分离。已分离的细胞应立即用吸管移至盛有去核卵的培养皿内备用,如它们在分离液内久留会引起死亡。移植时,把盛有去核卵和分离细胞的培养皿置于解剖显微镜下,用发圈把它们拨到视野内,然后把操纵台移近解剖显微镜的一侧,调节移动台上的位移旋钮和微型吸管的角度的,使之对准分离的囊胚细胞(选用的细胞应略大于微型吸管口),轻轻向后旋动注射器上的微分筒,该细胞即随培养液被吸入管内并破裂,但细胞质不能分散,

应仍紧包着其中的细胞核，否则细胞核直接与液体接触会受损伤。细胞被吸入管内的位置，以刚进入管口一小段距离为宜(图 6b)，以免将它注入卵内时带入过多的培养液。然后用发圈拨动去核卵，使其胚盘朝天，再把已吸有细胞核的吸管对准此胚盘的近中央处刺入胚盘，并把细胞核注入胚盘内(由于囊胚细胞的核极小，无法单独吸出，同时此核如直接接触培养液即要受损害，丧失生物学功能，所以在移植胚胎细胞核时，实际上都是把核和它周围的一点细胞质一起注入胚盘内。因为囊胚细胞的细胞质很少，所以当其被注入很大的卵子胚盘细胞质内后，经过对照试验，证明它并无作用)。吸管刺入的深度以不超过胚盘高度  $1/2$  为宜，切勿刺得太深，以免管口穿过胚盘误入卵黄内。注射毕，拔出吸管，胚盘上的伤口很快愈合，即可把它移入  $1/10$  的郝氏液内培养并观察其发育情况。如移植时卵子的成熟度好，剥膜时卵子未受损伤，挑卵核准确，注

射核的时间和部位合适，则移入细胞核后的卵子一般都能进行卵裂(应注意，从取出卵子到注入细胞核的全过程越快越好，一般以不超过 30—40 分钟为宜，如过迟注射核，因卵子胚盘已举得很高，卵已变质，移植不易成功)。有些卵子的卵裂与正常者无异。其中一部份可以发育到原肠胚，有的也可以长成幼鱼，这要看注入的细胞核与被注射的鱼卵的细胞质间相互配合是否得当而定。初步试验，有这样的印象：两者的种属相近较易成功，种属相远则困难些。因此想在经济鱼类中利用此法培育不同核质杂交的鱼种，尚待大量的配合试验，才能找出规律。不过根据我们的初步摸索，在上述各种经济鱼卵的细胞核相互移植过程中，一般都能得到发育至原肠期的胚胎；当鲤鱼的囊胚细胞核被移入鲫鱼去核卵内后，已获得了存活到一个月的种间杂种幼鱼，加以在我国经济鱼类材料丰富，所以这方面的工作很值得进一步探索。