

现代生物技术译丛

微注射和转基因实验指南

[德] A. 西德-阿里吉尔 编著
A. 加西阿-卡伦卡

张玉静 等译

科学出版社

2002

内 容 简 介

本书介绍了微注射和转基因领域中的技术与方法,着重于实验策略,附有详细的参考文献和具体的实验步骤。介绍了体细胞和胚胎细胞注射的方法,体细胞注射的章节内容包括手工与自动注射系统、注射后细胞的摄像显微技术、电子显微镜技术和原位杂交的分析方法。详细地介绍了不同目的的注射实验,例如用于研究信号转导和微管动力学的方法。主要阐述转基因技术的原理、新的策略和转基因技术的各种应用,主要以小鼠作为实验对象,此外还使用了家兔和果蝇。本书也介绍了有关转基因鼠研究方面所需要的有关鼠饲养方面的知识以及雄性生殖细胞的培养和有关精子介导的转基因的尝试,粗略地介绍产生各种系嵌合体和生产 YAC 转基因鼠的各种策略,并介绍了用鼠胚作为一个鉴定基因活性的“试管”许多可能的应用价值。本书还介绍应用组织标记的各种方法、转基因鼠研究对免疫系统和病毒研究方面的应用意义、采用可诱导的位点特异性重组酶来改变基因活性方面的知识。

本书适于从事功能基因组研究、转基因等相关研究工作的研究人员参考,也可供生命科学相关专业的教学科研人员使用。

图字:01-98-2297

Translation from the english language edition

Microinjection and Transgenesis edited by Angel Cid-Arregui and Alejandro García-Carrancá

Copyright Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1998

All Rights Reserved

图书在版编目(CIP)数据

微注射和转基因实验指南〔德〕西德-阿里吉尔(Cid-Arregui, A.)等编著;张玉静等译. —北京:科学出版社,2002.6

(现代生物技术译丛)

ISBN 7-03-010000-X

. 微... . 西... 张... . 转基因-遗传工程 细胞培养-微注射 . Q785

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 000512 号

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002年6月第一版 开本:787×1092 1/16

2002年6月第一次印刷 印张:25.14 插页:4

印数:1—3 000 字数:581 000

定价:60.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换 新欣)

本书译者名单

主 译：

张玉静 李慎涛

其他译者(按姓氏笔画排序)：

刘庆双 杨茂君 连继勤

张艳宇 赵风云 郝 崇

展德文 蔺晓薇 廖晓萍

序 言

二十多年前,人们建立了培养细胞的微注射方法,后来将此技术用于把 DNA 注射到小鼠的受精卵中,产生了转基因小鼠,这项技术对生物学的很多领域产生了巨大影响。采用微注射方法所取得的资料,不仅对我们今天理解基因调控和高等真核细胞的细胞功能起到了很大的作用,而且这些领域的知识与发展必定会对今后基础研究和应用研究带来巨大的影响。

本书介绍了该领域的技术与方法,着重于实验的策略,附有详细的参考文献和具体的实验步骤。现在人们仍在进行大量的研究,随之也会产生大量新的实验设计。本书介绍了体细胞和胚胎细胞注射的方法,这两种方法所需要的设备基本相同。在关于体细胞注射的章节中,我们全面地介绍了手工与自动注射系统,同时还介绍了注射后细胞的摄像显微术(videomicroscopy)、电子显微镜技术和原位杂交的分析方法。另外,我们还详细地介绍了不同目的的注射实验,例如用于研究信号转导和微管动力学的方法。本书主要阐述转基因技术的原理、新的策略和转基因技术的各种应用,主要以小鼠作为实验对象,此外还使用了家兔和果蝇。

我们也介绍了转基因鼠研究所需要的有关鼠饲养方面的知识,然后介绍雄性生殖细胞的培养和有关精子介导的(sperm-mediated)转基因的尝试。我们将粗略地介绍产生种系嵌合体和生产 YAC 转基因鼠的各种策略,并介绍了用鼠胚作为鉴定基因活性“试管”的许多可能的应用价值。最后我们将介绍应用组织标记的各种方法,例如 lac Z 等。并且也介绍了转基因鼠研究对免疫系统和病毒研究方面的应用意义。一本转基因的书,如果不介绍采用可诱导的位点特异性重组酶来改变基因活性方面的知识,那么这本书就不应该出版;另一方面,对于从事鼠发育调控基因研究的遗传学家来说,从转基因插入位点克隆新基因是一种有价值的工具。

书中含有大量的实用信息,我们在书中深入地分析了微注射方法的优点与局限,我们也相信,广大读者能够从书中获得有用的内容、新的观点和有关这一相对较新的但却是发展迅速的研究领域的进展情况。大量新的并不断改进的转基因方法和技术不断地涌现,例如把分化细胞的细胞核转移到无核绵羊卵母细胞中的方法,较为先进的小鼠精子与受精卵的低温保存方法等等,一定会给现代生物学带来新的革命。通过本书,读者可以领略到这个领域中一些令人振奋的进展。

Erwin F. Wagner

1997年3月于维也纳

前 言

“……即使是一个天才人物,在严谨的考核中,没有发生任何错误,我们也有充分的理由说,这个人在某个领域中的发现与未发现的部分相比,仍是微不足道的。”

Santiago Ramón y Cajal (1825 ~ 1934)

《科学研究的格言与忠告:精神的激励》,1951

人类对发现的任何事物都有熟练地使用和改进的兴趣,这是我们遵循祖先的一个天性,也是进化所必不可少的。一旦拥有了合适的工具,这种兴趣就会集中在生物体的功能单位——细胞上。

虽然真核细胞的分子结构异常复杂,但仍可以在接受微注射处理后从操作所引起的紊乱中完全恢复。的确,小心地向细胞核内和(或)向细胞质内进行注射,既不会明显地影响培养的体细胞的增殖能力,也不会干扰受精卵的发育。由于这一事实,以及细胞内直接操作的优点,使得微注射成为体外单个细胞实验的首选技术,也使之成为产生遗传变异动物的一个理想技术。

本实验指南向读者提供在对单细胞、转基因胚胎和动物(特别是鼠,也包括兔和果蝇)的研究中,使用微注射进行实验所需的技术和方法。我们知道这类实验的成功很大程度上取决于实验的可行性、正确的设计和对结果的正确解释。所以除介绍必要的操作过程外,我们特别注重每个策略中都有的一个比较详细的引言部分。另外还有详尽的参考文献,或其他的操作方法。为了在一个有限的篇幅中达到上述目的,我们在不影响操作过程的完整性这一前提下,尽可能地少重复其他书中已经提到过的内容。

总的说来,培养的体细胞、卵母细胞和受精卵的微注射可以使用同样的设备,所以本书同时介绍了这两种方法。在第一部分中,我们对人工/自动和计算机辅助微注射所需要的设备进行了全面的介绍。前10章中不仅包括了与单细胞微注射联系密切的技术,而且还介绍了该技术在细胞生物学、基因表达和信号转导方面的典型应用。第二部分包括了其余20章内容,涉及的面比较宽,从鼠的饲养到转基因动物的产生,还有利用位点特异性重组的新技术进行的基因定向失活。这些章节的内容是按个体发育标准排列的:生殖细胞、卵母细胞、卵着床前胚胎、着床后胚胎、定向失活突变和转基因动物。所有的这些技术都是利用小鼠,只是第二十九章和第三十章除外,这两章分别介绍了转基因兔和果蝇胚胎的微注射。

我们感谢本书所有的作者为完成本书付出的努力与合作。我们还要感谢同行们提出的很多有益的建议。另外感谢 Dieter Czeschlik 和 Jutta Lindenborn (Springer-Verlag), 以及

Constanze Sonntag (PRO EDIT GmbH) 对我们提供的建议与帮助。最后, 我们感谢 Internationales Büro of the German BMBF 和 Mexican CONACYT 的支持。

A .西德-阿里吉尔

A .加西阿-卡伦卡

于 1997 年 9 月

目 录

序言

前言

第一部分

利用培养的体细胞进行微注射实验的策略与方法 1

第一章

对培养的体细胞进行手工与自动微注射的方法和对微注射后细胞的分析方法 3

ANGEL CID-ARREGUI, CARLA SANTANA, MIRIAM GUIDO,
NESTOR MORALES-PEZA, MARIA VICTORIA JUAREZ, ROGER WEPE,
AND ALEJANDRO GARCÍA-CARRANCA

第二章

对培养的体细胞进行自动计算机辅助微注射 21

WILHELM ANSORGE AND RAINER SAFFRICH

第三章

微注射与转染的培养细胞的免疫荧光和免疫电子显微镜技术 31

GUSTAVO EGEA, TERESA BABIA, ROSER PAGAN, ROSER BUSCA,
INMACULADA AYALA, FERRAN VALDERRAMA, MANUEL REINA,
AND SENEN VILARO

第四章

培养的微注射后活海马神经元的摄像显微术 52

FRANK BRADKE AND CARLOS G. DOTTI

第五章

适合于微注射实验的合成寡核苷酸的制备、纯化和分析 62

RAMON GÜMIL GARCÍA AND RAMON ERITJA

第六章

原位杂交比色测定 74

JAIME BERUMEN

第七章

手工微注射:测定组织培养细胞中的 HIV 1 指导的锤头核酶的抑制作用 84

ROBERT HORMES AND GEORG SCZAKIEL

第八章

细胞微量生物化学 93

RAINER PEPPERKOK, OLAF ROSORIUS, AND JOCHEN SCHEEL

第九章

研究轴突生长期间微管转运与装配的新策略 100

PETER W. BAAS

第十章

利用微注射方法研究哺乳动物细胞的信号转导 110

SERGE ROCHE AND SARA A. COURTNEIDGE

第二部分

采用胚胎进行微注射实验的策略与方法 119

第十一章

转基因研究用小鼠的供应与饲养 121

JANE MORRELL

第十二章

培养的雄性小鼠生殖细胞:会成为转基因的一种新方法吗? 141

MINOO RASSOULZADEGAN, JULIEN SAGE, AND VALÉRIE GRANDJEAN

第十三章

精子介导的基因转移 148

MARIALUISA LAVITRANO, VALENTINA LULLI, BARBARA MAIONE,
SABINA SPERANDIO, AND CORRADO SPADAFORA

第十四章

配体依赖性位点特异性重组在 ES 细胞中的应用 165

PIERRE-OLIVIER ANGRAND, CATHERINE P. WOODROOFE,
AND A. FRANCIS STEWART

第十五章	
一种产生转基因小鼠与小鼠胚胎冷冻的改良方法	178
CAROL MURPHY, LUIS MARTIN-PARRAS, AND ULRICH RÜTHER	
第十六章	
应用桑椹胚聚集从遗传修饰的胚胎干细胞产生种系嵌合体	185
MIGUEL TORRES	
第十七章	
用酵母人工染色体产生转基因小鼠	194
HOLGER HIEMISCH, THORSTEN UMLAND, LLUÍS MONTOLIU, AND GÜNTHER SCHÜTZ	
第十八章	
跟踪微注射的 mRNA: 在小鼠卵母细胞成熟期间对 mRNA Poly(A) 尾长度的分析	202
FATIMA GEBAUER	
第十九章	
用作研究转录增强子体内系统的着床前小鼠胚胎和卵母细胞	212
SADHAN MAJUMDER	
第二十章	
用小鼠植入前胚胎鉴定早期发育必需的 DNA 结合蛋白	230
VALERIE BOTQUIN, JÖRG R. SCHLEHOFER, AND ANGEL CID-ARREGUI	
第二十一章	
用转基因和转基因小鼠研究从卵母细胞到早期胚胎基因的活性	241
SYLVIE FORLANI, LUCILE MONTFORT, AND JEAN-FRANÇOIS NICOLAS	
第二十二章	
利用瞬时转基因分析研究机体内启动子的调控元件	272
DIANA ESCALANTE-ALCALDE AND LUIS COVARRUBIAS	
第二十三章	
利用 lacZ 作为报告基因对胚胎基因表达进行转基因分析	281
CATHERINE E. OVITT, YOUNG IL YEOM, AND HANS R. SCHÖLER	

第二十四章

在发育过程中,利用 lacZ 报告基因转基因进行自主细胞标记,产生转基因小鼠 288

LUC MATHIS AND JEAN-FRANÇOIS NICOLAS

第二十五章 通过定向插入大肠杆菌 lacZ 编码序列揭示锌指基因 Krox-20 的多种发育功能 300

SYLVIE SCHNEIDER-MAUNOURY, PIOTR TOPILKO,
TANIA SEITANIDOU, GIOVANNI LEVI, PAULA MURPHY,
AND PATRICK CHARNAY

第二十六章

转基因小鼠策略在病毒研究中的应用 310

ANGEL CID-ARREGUI, NESTOR MORALES-PEZA,
PRASERT AUEWARAKUL, MARIA JOSE GARCÍA-IGLESIAS,
MARIA VICTORIA JUAREZ, GINA DÍAZ,
AND ALEJANDRO GARCÍA-CARRANCA

第二十七章

从转基因插入位点上分离突变基因 328

MIRIAM H. MEISLER, JAMES GALT, JOHN S. WEBER,
JULIE M. JONES, DANIEL L. BURGESS, AND DAVID C. KOHMAN

第二十八章

转基因与基因敲除小鼠对免疫学的贡献 339

JOSÉ MORENO, LAURA C. BONIFAZ,
AND JESÚS MARTÍNEZ-BARNETCHE

第二十九章

转基因家兔的生产与应用 366

URBAN BESENFELDER, BERNHARD AIGNER, MATHIAS MÜLLER,
AND GOTTFRIED BREM

第三十章

果蝇卵的微注射 383

第一部分

利用培养的体细胞进行微注射实验的策略与方法

第一章 对培养的体细胞进行手工与自动微注射的方法和 对微注射后细胞的分析方法

ANGEL CID-ARREGUI,^{1*} CARLA SANTANA,² MIRIAM GUIDO,²
NESTOR MORALES-PEZA,² MARIA VICTORIA JUAREZ,³ ROGER WEPE,³
AND ALEJANDRO GARCÍA-CARRANCA²

引言

对活细胞的显微操作起始于 20 世纪的前半叶,首先应用于电生理的研究。在 40 年代后期,建立了细胞内记录的可靠方法。在以后不到十年间,使用类似的技术直接将生物物质转送到细胞内(Chambers & Chambers 1961)。起初微注射的目的是向培养的受体细胞中转移哺乳动物的细胞核(Raessmann 1970)和染色体(Diacumakos 1973)。随着物质的提纯和设备的改进,已经能够向细胞内转移不同来源的大分子溶液,比如病毒 RNA(Graessmann & Raessmann 1976; Stacey et al . 1977),纯化的蛋白质(Mabuchi & Okuno 1977; Tjian et al . 1978)和病毒 DNA(Anderson et al . 1980; Capecchi 1980)。人们采用同样的方法,利用微注射把 DNA 转移到受精卵中,很快就有人报道克隆基因在鼠体细胞中得到了表达(Gordon et al . 1980)。不久,人们把重组基因稳定地引入到鼠生殖细胞系(Brinster et al . 1981; Wagner et al . 1981)。从此以后,微注射成为转基因动物研究的常规方法,广泛地应用于使用活细胞的研究中,如基因表达、信号转导或细胞骨架研究等。

微注射可以实现两个细胞内的主要组分——细胞核和细胞质直接接触。所以微注射技术可以用于只涉及到单个细胞的实验,可以精确地改变单个细胞或两个细胞的内环境。更重要的是可以通过改变培养环境,对受体细胞进行各种处理。表 1.1 中列出了微注射中所有的变量,并附有相应的例子。像表中所叙述的那样,可以采用不同的变量组成许多种策略,如注射样品、细胞内的目标组分(包括细胞质、细胞核或两者都有)、单一或多个注射、特殊的细胞处理(微注射前或注射后),以及不同的分析技术。

要设计出合适的微注射实验需要认真考虑到该技术的优点与不足,下面列出微注射的一些主要优点。

可用于不同类型的细胞,包括已经建起的细胞系或原代培养物,微注射对使用后者的实验特别有利,因为这样的细胞一般比较难培养,对培养基的变化特别敏感。原代培养物在培养基中只能成活几天或几周(例如神经元),或者只能传几代(例如成纤维细

* corresponding author: phone: +49-6221-548 321, fax: +49-6221-548 301, e-mail: angel.cid-arregui@urz.uni-heidelberg.de

¹ Dept. of Neurobiology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 364, D-69120-Heidelberg, Germany

² Department of Molecular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 04510, Mexico City, Mexico

³ European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, 69012 Heidelberg, Germany

表 1.1 微注射实验中的部位和不同实验方法的例子

细胞核内/细胞质内微注射	细胞内过程	注入化合物的作用	注射后细胞分析
DNA: 细胞的、 病毒的、质粒 和 YAC 的 RNA: 细胞的、 体外病毒转录的 反义: RNA、 寡核苷酸 核酶: 合成的、 体外转录的 抗体: 未标记的、 偶联的 蛋白质: 细胞的、 重组的 提纯的细胞器: 核、胞囊 其他天然与合成 产物 混合化合物	转录 翻译 复性 结合 修饰(磷酸化等) 转运 降解等	干扰细胞功能: 细胞周期中止、 阻断细胞内信号通道、 阻断细胞内膜运输等 影响细胞功能: 基因表达的调控、 信号转导、 细胞骨架装配等	表型的观察: 细胞形态学的变化、 生长停止、凋亡、 多核化、细胞融合等 生物化学分析: CAT 测定、 光谱测定酶活性 免疫荧光 免疫组织化学 原位杂交 免疫电子显微镜 分子生物学分析 Southern 和 Northern 印迹、 RNA 酶保护、PCR 等

附加细胞处理:³⁵S-蛋氨酸(用作代谢标记), BrdU(标记新合成的 DNA), FITC-运铁蛋白(用作受体介导的胞吞作用的标记物), 辣根过氧化物酶(用作液相胞吞作用的标记物), 放线菌霉素 D(阻断 RNA 合成), 放线菌酮(阻断蛋白质的合成), 布雷菲德菌素 A(阻断 ER 向高尔基体的转运), 噻氨酯吡啶(解聚微管), G-418(新霉素抗药性的选择)等。

胞或角质细胞), 所以, 对于这样的细胞来说, 微注射方法是 DNA 转移实验中惟一可行的方法。

只需要少量的样品, 可以省去注射产品的大量制备和纯化, 如 DNA、抗体或重组蛋白质等。这些物质都比较昂贵, 或者需要大量的时间才能获得。

可以把很多不同类型的人工合成品或生物制品注射到细胞内, 由小的寡核苷酸到酵母人工染色体(YAC), 或者是由肽到提纯的细胞器。

由于注入每个细胞内的样品量可以确定, 那么就可以估计出每个细胞内所注入的分子数量。

可以同时或连续向一个细胞注射两种或两种以上的样品。在实际中, 还可以重新取出细胞再次注入同样的样品或不同的样品。

微注射可以与细胞的前期、同期和(或)后期处理相结合, 以便达到实验的最佳条件。

如果与免疫荧光法、原位杂交法或 PCR 法等敏感的分析技术相结合, 注入产品的作用可以在单细胞水平上得到测定。

快出结果。对于大多数用途的微注射, 注射后不久就会得出实验结果。

微注射也有如下的局限性。

需要特殊的设备与技术。

需要逐个细胞操作, 所以每次实验时只能研究有限的细胞, 最多也不过几百个。

在针头穿过细胞膜或核膜时, 微注射会给细胞带来一定程度的损伤, 一方面是由于针头形成的机械力, 另一方面是由于从针头口流出的液体, 后者使细胞内的压力增加, 而且

由于所注样品的性质不同,可能会引起局部离子强度、渗透压或 pH 的改变。这种影响在细胞骨架表现得最为明显,但也会波及到细胞内的结构,所以使结果的分析难度加大。

上述所有的方面在微注射实验前都应予以仔细的考虑,以便选择出最佳的策略。例如,微注射一般不用于 DNA 转移,因为此法与钙沉淀、电穿孔和脂质体转染方法相比费时费力。但是有些实验,例如使用原代外植块细胞或 YAC 载体时,微注射的优点使其成为 DNA 转移的首选方法。

本章讨论向培养细胞中进行手工和自动微注射所需要的设备与方法,另外还介绍了注入常见报告质粒(reporter plasmid)细胞的分析步骤。

材料

微注射设备

最简单的微注射需要倒置显微镜,微操作仪和一个拉针仪,可用于拉制合适的微注射针头(图 1.1)。为了得到最佳结果,建议使用一种精确的加压设备(见下文);除此之外,由 Eppendorf 和 Zeiss 开发的自动或自动计算机辅助系统还需要一些额外的设备(见下文;参见本书第二章)。最好把微注射的设备安放在专用的房间里,靠近细胞培养设备。另外,显微镜与微操作仪都应该放在金属制作的平台上,平台放在防震的桌子上。

— Leitz 重型基座,可以在上面安放显微镜和微操作仪。

— 倒置显微镜:例如 Nikon TMS 和 Diaphot 300²;Zeiss Axiovert 100 或 135,或 Axioskop FS (图 1.1A)。

— 微操作仪(图 1.1A,B):Leitz(手动系统,应该安在平台上)或 Eppendorf 5171(自动轴向微注射系统,可以固定到显微镜的载物台上)。

— 微注射器(图 1.1B)是一种以压力向细胞内注入样品的工具,Eppendorf 5242. 也可以选用注射器(最好用玻璃注射器,采用螺旋推柄,可以从 Leitz 购买),需固定在平台上。

— 玻璃注射针头:现有两种类型的微注射针头:

Eppendorf 预先拉制好的微注射针头,用塑料螺旋固定在 Leitz 微注射针头架上,取下即可使用。

使用拉针仪在实验室中自行拉制的微注射针头(见下文,图 1.1C)。最好使用硼硅酸盐玻璃的毛细管(购自 Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, Berks, UK, 货号 GC120TF-10)。这样拉制的毛细玻璃管外径为 1.2mm,管壁为 0.13mm,毛细管的全长有一个直径 0.1mm 的细丝状物依附于它的内壁,它可使样品溶液到达微注射器的尖部(图 1.2)。关于从不同类型的毛细管拉制的微注射针头的具体指标和有关采用尖端气泡压力测定针头孔径的方法,可参阅 Schnorf 等(1994)。

可以采用硅烷对微注射针头进行处理,以防样品和(或)培养基成分与玻璃的亲水表面相互作用。最常用的硅烷化操作过程包括玻璃表面的亲水基团与有机硅烷之间的化学反应,硅烷含有能与玻璃反应的亲水部分和具有疏水能力的碳氢链(Leyden 1985; Proctor 1992)。可以用这样的方法处理微注射针头的内侧与外侧。但一般说来没有必要对针头的内侧进行处理,因为在生理离子强度的溶液中,核酸和蛋白质与未处理的玻璃不会结合

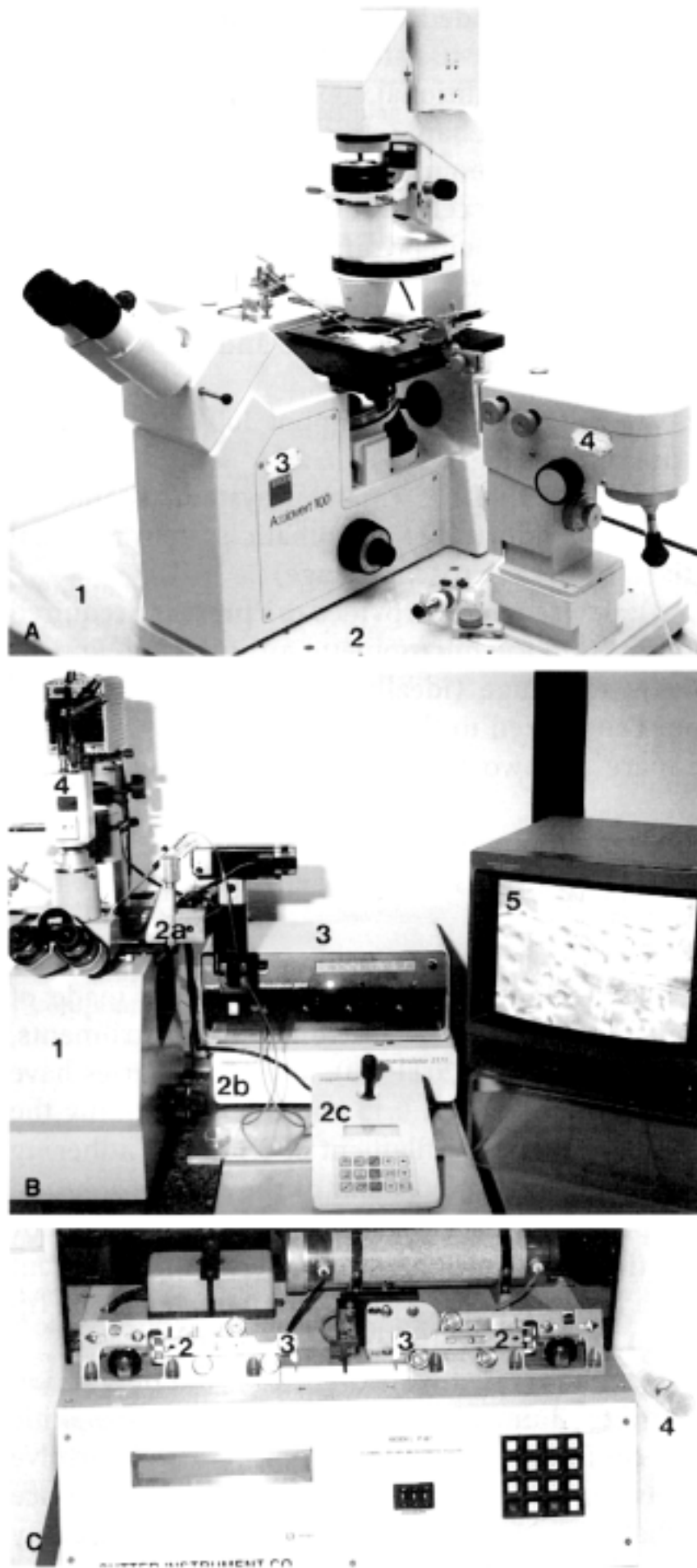


图 1 .1A-C 安装好的手动与自动微注射设备(见材料部分)。A: 手动微注射设备的组成部分:1 .防震桌;2 .Leitz 重型基座;3 .Zeiss Axiovert 倒置显微镜;4 .右手 Leitz 微操作仪。B: 自动微注射设备的组成部分:1 .Zeiss 倒置显微镜;2 .Eppendorf 自动微操作仪(5171 型):2a 为微操作部分,上面有三个电动马达驱动的部分,可在 x、y、z 三个方向运动;2b 为电源部分;2c 微电脑部分,配有键盘和操作杆;3 .Eppendorf 微注射器(5242 型);4 .电视摄像机;5 .电视监视器,显示出盖玻片上需要注射的细胞,显示在右侧的微注射针头,指向屏幕中心。C: Sutter Instrument 产水平拉针仪(P-87 型) 1 .加热丝固定器;2 .左右滑夹;3 .夹子;4 .玻璃毛细管。

(Thomas et al . 1979)。而且单链 DNA 和蛋白质与硅烷化玻璃结合力大于其与未处理玻璃的结合力(Proctor 1992)。也许应该对微注射针头作外表面的处理,这样可以预防细胞的亲水物质吸附在其表面,引起针尖的阻塞,影响注射,但利用硅烷处理的方法比较难。一般说来,用同一个注射针头给一定数量的细胞注射时,吸附不会对工作有什么影响,所以我们认为不必对微注射针头作硅烷化处理。

— 毛细管拉针仪

水平拉针仪:Sutter Instrument Co .(Novato, USA), P87 型(图 1 .1C)。装上一根毛细管,拧紧左右两侧的夹子,做好固定,并使其中间部位对准加热丝。设定好电流、拉力和时间,例如,热度 = 640,拉力 = 150, Vel = 100,时间 = 135。然后按“开始”键,等待毛细管被拉成两个所需的微注射针头(图 1 2)。

垂直拉针仪:David Kopf Instruments(Tujunga, California, USA), 720 型,把玻璃毛细管固定在上方的夹子上,使其对准加热丝后旋紧。抬起下面的滑夹,固定在毛细管上。调整热度和螺线管范围(例如热度 = 11,螺线管 = 3 6),然后按“开始”键。

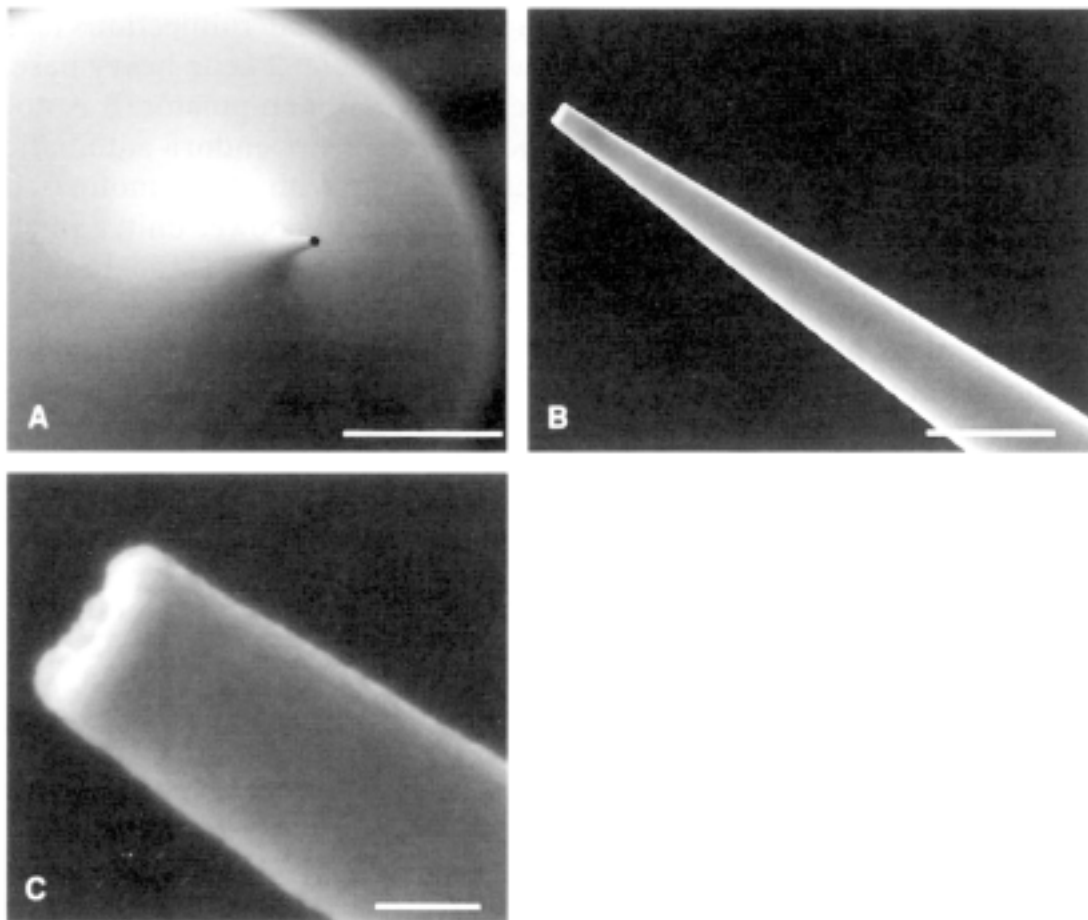


图 1 2A-C 典型微注射针头尖部的扫描电镜图像。图中的微注射针头是采用图 1 .1C 所示的水平拉针仪,用硼硅酸盐玻璃毛细管(见材料部分)拉制而成的。针头的内径约为 150nm,外径约为 350nm。各微注射针头针尖部分的尖度和形状略有差别,微注射针头上面附有一层 10nm 的 Au/ Pd 膜,可以使其外观良好、光滑。图中的针头用 FESEM 拍摄(Philips XL-30EFG),30keV。图中白色横线代表的长度为 A . 200μm、B . 2μm、C . 200nm。

细胞培养设备

— 细胞培养箱和超净台

— 塑料平皿与盖玻片,把欲进行微注射的细胞铺在直径为 60mm 的组织培养皿中,皿中放

置玻璃盖玻片(最多可放6块,直径为10~15mm),准备好注射细胞(大多数情况下,20%~40%汇合),将一块盖玻片转移到另一只含有4~5ml缓冲培养基的培养皿中(直径为60mm)。

在微注射细胞铺板前两天,按如下方法处理盖玻片:

1. 把盖玻片放在陶瓷或金属架上,相互不要接触,垂直放成一排。
2. 在装有自来水的烧杯中,做快速的浸泡和冲洗。
3. 在纸巾上把架子控干,再放入盛有0.1mol/L HCl的烧杯中,温育过夜。
4. 用自来水冲洗盖玻片,每次10min,共5次。
5. 把架子浸入到70%的乙醇中,温育60min。
6. 用去离子水略加冲洗。
7. 放在纸巾上控干。
8. 放在室温下自然干燥30min。
9. 在220~250℃干烤6h。

— 金刚石笔。用来在盖玻片上标记小的圆圈或十字。可以在标记内或附近做细胞注射,这样便于重新找到已注射的细胞。也可以购买蚀刻网格的盖玻片(CellLocate盖玻片,Eppendorf)。

缓冲培养基

在做研究时,我们利用培养箱维持CO₂5%浓度,实现了生理上所需要的稳定的pH,除了培养细胞系或原代培养物所需的培养基外,我们还可能需要缓冲培养基,以便在注射时保存细胞。最好的培养基应该能够满足细胞和实验目的的要求。我们可以按下面的方法制备培养基。

— 含25mmol/L HEPES pH7.2培养基(贮存液1mol/L,无菌过滤,室温保存),也可用相当数量的碳酸氢盐代替,使pH维持在生理范围内。

— 无血清培养基,用25mmol/L HEPES, pH7.2作缓冲剂。

— Hank氏平衡盐溶液(HBSS),用25mmol/L HEPES pH7.2作缓冲剂。

上述培养基应该加有青霉素或链霉素。但一般不必加抗真菌抗生素,因为可能会给细胞带来损伤。实际上,如果在洁净的实验室内进行微注射,没有必要加抗真菌制剂。

注射缓冲液

有很多缓冲液可以用来配制注射样品,下面列出最常用的缓冲液:

1. Tris-EDTA缓冲液。10mmol/L Tris-HCl pH7.4, 0.25mmol/L EDTA。这种缓冲液最常用于核酸溶液,可以注射到培养细胞或卵细胞的核里(Wassarman & DePanphilis 1993; Hogan et al. 1994)。
2. 磷酸盐缓冲液。磷酸根是细胞内液中的主要阴离子,所以可以作为较为理想的注射缓冲液。但在生理范围的浓度(例如,48mmol/L K₂HPO₄, 14mmol/L NaH₂PO₄, 4.5mmol/L KH₂PO₄, pH7.2, Graessmann et al. 1980),如果与培养基接触,可能会在针头尖部形成磷酸钙而沉淀,阻塞样品的出口。所以很多研究人员愿意使用低浓度的磷酸盐,并用高于生理水平的氯离子补偿上述磷酸盐的浓度,这样会维持Na⁺和K⁺接近正常细胞内