

倪萌萌,许厚强,赵佳福,等. 小鼠胚胎显微操作针的制作方法[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):226-228.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.083

小鼠胚胎显微操作针的制作方法

倪萌萌,许厚强,赵佳福,陈伟,桓聪聪,周迪

(贵州大学/高原山地动物遗传育种与繁殖省部共建教育部重点实验室/贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室,贵州贵阳 550025)

摘要:显微操作针是显微操作的必备工具,其制作的好坏直接影响到操作的成败。介绍了利用拉针仪、断针仪、磨针仪制备用于小鼠胚胎移植显微操作的移卵针(moving pipettes)、注射针(injection pipettes)和持卵针(holding pipettes)的制作方法,以供实验参考。

关键词:显微操作;移卵针;注射针;持卵针;制作方法

中图分类号: Q-336 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0226-03

近20年来,DNA显微注射技术已成为转基因动物生产中基因转移的重要手段。而显微操作针是应用于辅助生殖^[1]、动物克隆^[2]、转基因动物的制备^[3]和嵌合体动物制备^[4]等方面的重要工具之一。显微操作的成功与否与显微操作针制备的好坏密切相关。目前购买成品针用于显微操作成本太高,许多领域的特殊操作作用针只能通过人工控制,因此,多数实验室倾向于自制显微操作针。目前大多选择购买拉针仪、断针仪和磨针仪等仪器设备,自行控制显微操作针,从而可以对显微针的参数进行精确的控制,获得理想的实验用针。本研究通过日本尼康 NT88-V3型倒置荧光显微操作仪,总结出适合该设备系统的显微操作针制备方法,以供实验参考。

1 材料与与方法

1.1 仪器设备与材料

倒置荧光显微操作仪(日本,尼康 NT88-V3),水平拉针仪(日本, Narishige PN-30),磨针仪(日本, Narishige EG-44),断针仪(日本, Narishige MF-900),微电极玻璃毛细管(外径:1.00 mm,内径:0.70 mm)和微电极玻璃毛细管(外径:1.00 mm,内径:0.66 mm),眼科镊。

1.2 方法

1.2.1 制针用毛细玻璃管的准备 购买经过硅化的毛细玻璃管时,需检查是否经过灭菌处理,多数商家提供的毛细玻璃管不用灭菌,拆开包装就可直接使用,最好现用现拆,避免过早打开积累灰尘。但有些厂家的毛细玻璃管出厂前仅用75%乙醇处理,需要经过以下处理才能使用:4% HCl 浸泡24 h,除去沾在管壁的污质,自来水冲洗至中性,用去离子水

冲洗后浸泡0.5 h,烘干,75%乙醇浸泡24 h,去离子水冲洗,烘干,包装后160℃干烤灭菌2.5 h^[5]。

1.2.2 移卵针的制作 双手持住一根10 cm的玻璃管(外径:1.00 mm,内径:0.66 mm)两端,将玻璃管的中部置于乙醇灯外焰,边旋转边加热,当玻璃管变软时,迅速水平拉伸,回折至拉细处断开,并在乙醇灯外火焰上快速抛光移卵针尖端1~2 s,在体视显微镜下观察针的尖端是否光滑,是否保持一定的内外径。理想的移卵针内径在150~200 μm之间为宜。使用时与口吸硅胶管连接。

1.2.3 注射针的制作 注射针的制备分5步:拉、断、磨、拔、弯。

拉:使用水平拉针仪控制。设定好拉针仪的3个参数:热度、主磁力、副磁力,戴一次性乳胶手套将微电极玻璃毛细管(外径:1.00 mm,内径:0.70 mm)置于拉针仪“Ω”形铂丝的中央,并拧紧两边的螺丝固定好。运行参数,将拉出的针坯用眼科镊放置在准备好的塑料泡沫垫板上,待用。

断:使用断针仪水平断针。首先在100倍视野下,将电热丝及事先制作好的玻璃珠调至最清晰的位置,将拉好的针插入持针器内,并将其水平放置在支撑架上,在镜下调清针的位置,水平调节针的位置使其断针处的位置位于玻璃珠的正上方,踩下踏板接通电源,缓慢调节温度旋钮使铂金丝和玻璃珠微微发红时(约45℃),将针靠近并紧贴,此时,针会有微小的摆动,说明针与玻璃珠开始熔化粘连,松开脚踏板,这时电热丝和玻璃珠冷却会产生向下的拉力将针断开。此时针口将被断成一个断面,要求断面垂直、平滑、干净(图1、图2)。



图1 水平断针位置

磨:用磨针仪滴水磨针。将断好的针插入持针器里,拧紧螺丝后固定在磨针仪上,调好角度45°~50°,调节升降旋钮,使持针器缓缓下降至针尖与磨石的平面刚好接触,在磨针仪的注射器内加适量的去离子水,使之均匀滴下,调节磨石的转

收稿日期:2014-05-19

基金项目:贵州省科技重大专项(编号:黔科合重大专项字[2013]6008号);贵州大学青年教师科研基金(编号:贵大自青基合字[2012]010号)

作者简介:倪萌萌(1989—),男,安徽凤阳人,硕士研究生,研究方向为动物繁殖生物技术。E-mail:237805700@qq.com。

通信作者:许厚强,教授,博士生导师,研究方向为畜禽种质资源保存与创新利用。Tel:(0851)8292183;E-mail:



图2 断针后位置

速使水滴不被迅速甩掉为宜,这样磨出的针比较干净,6 min 磨好1根。

拔:使用断针仪垂直拔尖。首先在100倍视野下,将铂金丝和玻璃珠调至最清晰的位置,将磨好的针插入持针器内,并将其垂直放置在支撑架上,在镜下调清针并使针的位置位于玻璃珠的正上方,磨面正对操作者,踩下踏板接通电源,缓慢调节温度旋钮使铂金丝略呈橘红色(约50℃),缓慢下降针尖端,使其靠近玻璃珠并与之接触,待针尖一接触玻璃珠就迅速将针向上撤离,此时针尖被拉成一个短而锐利的尖,以利于穿刺进入卵母细胞胞浆膜。

弯:使用断针仪水平弯针。把持针器调成水平放置,调清视野,针在玻璃珠的上方一段距离,踩下脚踏板接通电源,缓缓调节温度,直至铂金丝和玻璃珠呈橘黄色(约60℃),将玻璃珠缓缓向上面靠近玻璃针,同时观察镜中的标尺,达到所需要的角度(15°~20°)时,立即松开脚踏板,即成所需角度的注射针(图3、图4)。

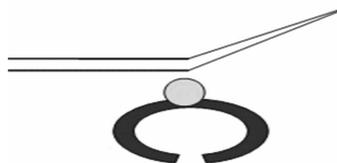


图3 针尖较细时受热针尖上翘

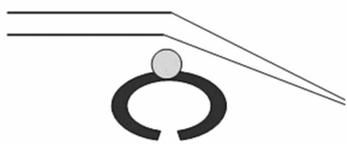


图4 针尖较粗时加热针尖因重力作用下垂

1.2.4 持卵针的制作 持卵针制备分4步:拉、断、烧、弯。

拉:同注射针拉针。

断:同注射针断针。

烧:将已断好针的断面竖直或水平接近玻璃珠,相距10 μm左右,不可相互接触,踩下踏板接通电源,并缓缓调节电热丝的温度(约60℃),铂金丝和玻璃珠变橘黄色时,针管口内径慢慢回缩,用目镜中的显微标尺观察尖端内径变化情况,直至内径为15~20 μm时松开脚踏板停止加热,将温度旋钮调回“0”位置。此时持卵针内径大小合适,表面光滑(图5、图6)。

弯:同注射针弯针一样,角度有所差别,一般在20°~30°较为适宜。

1.2.5 针的保存 若针管中有碎屑或灰尘,可用10%氢氟酸溶液冲洗5次,再用去离子水冲洗5次。将制作好的针存

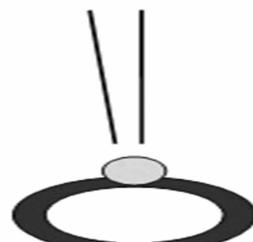


图5 针尖端距玻璃珠10 μm左右

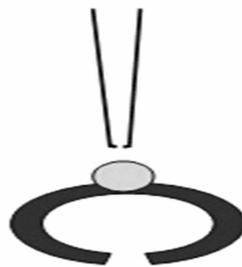


图6 针尖端烧成内径15 μm左右平齐光滑的马蹄形

放于75%乙醇清洗过的塑料盒中,固定存放。使用前用紫外线照射30 min 杀菌消毒。

2 讨论与结论

转基因小鼠的制作过程中包括许多关键步骤,而且每一步又有很多因素对转基因小鼠制备的成败产生影响,显微注射是其中核心部分,除了显微操作的速度、显微操作的方法、培养液的成分、培养环境的温度和pH值的稳定等因素^[6]外,拉针仪、断针仪相关参数设置,断针、磨针所采取的不同方式及显微操作针拉制的好坏都会影响转基因实验的成败。

2.1 拉针仪相关参数设置对针坯的影响

笔者所在实验室采用PN-30水平拉针仪(日本,Narishige)控制显微操作针,该仪器包括:heater(热度)、magnet sub(副磁力)、magnet main(主磁力)3个参数,根据制备针的不同选择不同的参数组合。热度主要是对玻璃管进行加热,热度越高,针拉得越快、针尖越长、针尖的口径越细,数值范围一般在70~85之间。主磁力决定针尖的细度,数值越高针尖越细,数值范围一般在65~100之间。副磁力是决定针尖细部的长度,数值越高针尖口长度越长,数值范围一般在22~57之间。这些参数是相互影响的,拉制针时调节一个参数其余固定,找到一个最合适的参数,并固定下来。如热度为85℃、主磁力为67.2、次磁力为23时,可拉制出长15~20 mm、内径10 μm左右的操作针。

2.1.1 铂金圈的形状对针坯的影响 拉针仪上的铂金圈很重要,其形状如“Ω”形,表面要光滑呈圆弧形,如出现任何不规则的形状都会影响拉制针的形状。所以用眼科镊取出拉制好的针坯时,要特别小心,不可触碰到铂金圈,避免外力改变其形状,导致后续的工作无法正常进行。放置毛细玻璃管时,要固定在铂金圈的中央,不接触到其任何一边,固定时要拧紧螺丝旋钮,同时同向旋钮,防止拉制时一边没固定好拉不断毛细管,从而导致受热不均,拉力不均,拉不出高质量的针坯,此时的针尖端易弯翘、扭曲,影响使用。

2.1.2 铂金丝上玻璃珠的位置、大小对注射针和持卵针拉制

的影响 铂金丝上玻璃珠的最佳位置是向上有个凸起、外径80 μm 左右为宜(图7),玻璃珠太大或太小都易使针弯而不断。玻璃珠往往在煅烧时容易熔化下垂,在铂金丝下方出现凸起(图8)或者铂金丝上没有玻璃珠(图9),这2种情况都是不合适的,在断针、烧针、弯针时容易受热不均,导致针尖端的不平、针管的变形、针弯而不断等,拉不出质量好的针胚,影响使用。



图7 玻璃珠最佳位置



图8 玻璃珠下垂

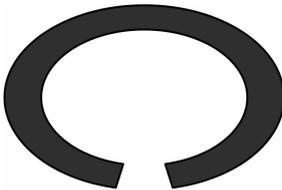


图9 无玻璃珠

2.2 断针仪上不同处理方式和温度选择对显微操作针控制的影响

2.2.1 断针方式及温度控制对注射针和持卵针控制的影响

使用断针仪断针方式分为水平断针和垂直断针2种,经实践比较,水平断针效果优于垂直断针,垂直断针因看不见玻璃珠和针管的接触情况,往往会出现视野内断得较直,但是旋转至水平后却发现针是弯的。相比之下水平断针就能避免这样的问题,它能很好地看清玻璃珠与针管的接触情况,在视野里能一目了然地观察断针情况。较适宜断针的温度应为铂金丝和玻璃珠微微发红时(约45 $^{\circ}\text{C}$)。温度过高易使针管熔化粘连在玻璃珠上,而且断的针尖端容易不平整、扭曲;温度过低则无法把针拉断。

2.2.2 拔尖的方式及温度对注射针控制的影响 拔尖采用水平拔尖或垂直拔尖皆可,要求针尖磨面正对操作者,针与玻璃珠要完全垂直,这样拔出的尖才不会弯斜。较适宜拔尖的温度应为铂金丝和玻璃珠略呈橘红色(50 $^{\circ}\text{C}$ 左右)。温度过高针尖拔得太细长、针口易皱缩熔化乃至封口;温度太低,针尖拔得很短、不锐利乃至拔不出尖,还易把针拔断。

2.3 磨针方式对注射针控制的影响

使用磨针仪磨针的方式有2种:一种是加水磨针,一种是不加水磨针。经过实践比较,加水磨针效果优于不加水磨针。不加水磨针,时间较快,但是针管内会粘上玻璃碎屑和灰尘,需用氢氟酸和超纯水清洗才能使用,比较麻烦;加水磨针,时间相对慢点,但磨出的针较干净、可直接使用。

2.4 显微操作针的评定标准

2.4.1 注射针 拉制的针应长5~8 cm,才能保证有适宜的注射用尖端。最好的注射针尖端的直径应小于1 mm,内径在10~12 μm 之间。在光学显微镜下无法看清,如果能在光学显微镜下看清注射针尖端的开口,则说明针尖端开口直径过大,注射针开口太大则刺入原核就会很困难,注射后更多的受精卵会裂解;但是,如果开口太小,粉尘堵塞针尖的可能性就会增大。哪种大小的针最佳,必须要试不同规格的注射针以确定哪一种是最合适的。另外一个重要的参数即针尖部的锥度,这可以通过测量针的距尖端固定距离处的直径来估计。在距注射针尖端50 μm 处的直径应为10~15 μm 或更小。注射针的肩部到尖端的距离应为5~8 mm。Jeffrey等研究表明8 mm是最佳的^[7]。如果这个距离过小,注射针的肩部会使针的尖端在注射小室的底部无法固定,从而影响注射的效果;如果针太长,注射时注射针在穿过厚的矿物油层时容易不稳固而弯曲,从而导致注射失败^[8]。

2.4.2 持卵针 管尖端外径和卵母细胞直径相差不应超过10~30 μm 。管口中央与卵母细胞中央应在同一水平线上,这样在固定卵母细胞时就不会发生垂直方向上卵母细胞的运动。管口外径不宜太大,否则卵母细胞不易按要求固定。在被固定前,垂直方向上的位置变动会导致极体位置变化。如果管口外径太小,在去核时卵母细胞往往摆动,影响操作。持卵针内径开口在中间为最佳。要做到这一点,必须保持断端平齐。理想形状的固定针应是外径100~120 μm 、内径10~20 μm ,两边对称并光滑^[9]。

2.4.3 移卵针 针管断面要求平齐、均一、光滑。拉制好的移卵针的外径应为150 μm ,略大于受精卵的透明带直径。

参考文献:

- [1] Kishigami S, van Thuan N, Hikichi T, et al. Epigenetic abnormalities of the mouse paternal zygotic genome associated with micro-insemination of round spermatids [J]. *Developmental Biology*, 2006, 289(1): 195-205.
- [2] Robl J M, Wang Z, Kasinathan P, et al. Transonic animal production and animal biotechnology [J]. *Theriogenology*, 2007, 67(1): 127-133.
- [3] Laible G, Brophy B, Knighton D, et al. Compositional and analysis of dairy products derived from clones and cloned transgenic cattle [J]. *Theriogenology*, 2007, 67(1): 166-177.
- [4] Dandri M, Volz T K, Luetgehetmann M, et al. Animal models for the study of HBV replication and its variants [J]. *Journal of Clinical Virology*, 2005, 34(1): S54-S62.
- [5] 汪立芹, 杨梅, 陈童, 等. 动物实验中显微操作针的制作 [J]. *中国畜禽种业*, 2010, 6(4): 148-149.
- [6] 纪红, 刘慧雯, 秦逸人, 等. 显微操作针制作相关问题的探讨 [J]. *生殖医学杂志*, 2007, 16(6): 419-422.
- [7] Jeffrey R M, Andrew P. Factors influencing frequency production of transgenic mice [J]. *Methods in Enzymology*, 1993, 25: 771-781.
- [8] 冯蕾, 吴发伟, 张振强, 等. 显微操作针制作方法的探讨 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(12): 1308-1309.
- [9] 马育芳, 吕自力, 王小宁, 等. 显微操作针的制作 [J]. *黑龙江动物繁殖*, 2004, 12(1): 46-47.