

· 实验研究 ·

转基因操作后小鼠受精卵的移植数量与其胚胎发育率的关系

Relationship between embryo development rate and number of transferred fertilized eggs in mice after transgenic manipulation

李建秀, 胡以平* (第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 研究不同受精卵移植数量与小鼠胚胎发育率的关系, 以提高转基因小鼠制备效率。 **方法:** 取正常(共 966 枚受精卵, 分 6 组, 每组 10~12 例)及已进行显微操作的小鼠受精卵(共 2 349 枚受精卵, 分为 5 组), 移入假孕的受体小鼠输卵管内, 统计分析其生产率及得仔率。 **结果:** 正常组移植小鼠移植 1~5, 6~10, 11~15, 16~20 卵组与移植 21~25, 26~30 组比较得仔率高($P < 0.01$)。转基因组小鼠单侧输卵管内移卵 11~15 枚或 16~20 枚的组, 其得仔率较其他(移植 1~5, 6~10, 21~25 枚各组)高($P < 0.01$)。 **结论:** 受精卵移植数量与转基因小鼠胚胎发育率有关, 以一次移卵 11~20 枚效果最好。

[关键词] 受精卵移植数量; 胚胎发育率; 转基因小鼠

[中图分类号] R-322 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0298-02

转基因动物的研究具有深远的理论及应用价值, 近年已成为生物工程领域的研究热点之一^[1]。制备转基因动物过程中, 每一环节均与实验成功率密切相关。当显微注射完成, 得到一定数量的已注入 DNA 的存活受精卵后, 只有恰当地分配, 将其移入受体动物输卵管内, 才能得到最多数量的仔。本实验通过正常及已进行显微操作小鼠受精卵的移植, 观察移入不同数目受精卵的假孕母鼠生产率和得仔率, 进行统计分析, 以得出最适合制备转基因小鼠的移卵数。

1 材料和方法

1.1 材料 正常小鼠供体为 C57 品系, 受体为 BALB/c 品系, 均购自上海斯莱克实验动物种子中心。M₂ 培养基购自 Gibco 公司。透明质酸酶(200 IU/ml M₂ 培养基)。转基因小鼠于本室 SPF 级动物实验室饲养。

1.2 供卵母鼠的准备 用 6~8 周龄正常 C57BL/6N 母鼠, 按 1:1 比例于下午 4 时与大于 6 周龄的 C57 雄鼠合笼, 次晨检查有阴栓者作为供卵母鼠。

1.3 受卵母鼠的准备 选择大于 5 周龄的 BALB/c 健壮雄鼠, 结扎并剪断输精管, 2 周后使用。在给供卵母鼠合笼的同时选择体质量在 20 g 左右的自然发情 BALB/c 母鼠与结扎雄鼠 1:1 合笼, 次晨检查有阴栓者作为受卵母鼠。

1.4 受精卵的制备 于当日午后 2 时杀死供卵母鼠, 剪下两侧输卵管, 放入 M₂ 培养基, 加入 1 滴 0.2% 透明质酸酶, 撕开输卵管的壶腹部, 挤出卵子, 将受精卵移入不含透明质酸酶的 M₂ 培养基中, 洗涤 3~5 次。

1.5 显微注射 待受精卵的数量足够多时, 开始显微注射, 调节显微注射针, 使之插入受精卵的雄原核, 慢慢注入等浓度的 DNA, 此时可见受精卵原核有一定程度膨大。每次注射 15~40 只卵, 注射后选择存活卵进行移植。

1.6 移植 立即麻醉受体母鼠, 选择细胞饱满、透明带清晰及原核清晰的卵, 从受体鼠一侧输卵管喇叭口移入输卵管的壶腹部, 缝合伤口, 待其怀孕、产仔。而正常组则略去显微注射, 取受精卵后直接移植。

1.7 统计学处理 采用 χ^2 检验。

2 结果

正常组(A)共取卵 966 枚, 以每递增 5 卵为一组, 分为 6 组, 每组 10~12 例进行移植、观察。HBV-adr 转基因组(B)取卵注射 HBV-adr DNA 后, 选择存活的卵 2 349 枚, 以每递增 5 卵为一组, 分为 5 组, 每组例数随机, 两组统计结果见表 1。结果表明, 移植不同数目受精卵的假孕母鼠的生产率均无显著差别($\chi^2 = 1.891$ 及 $\chi^2 = 2.948, P > 0.05$)。而得仔率均有显著差别($\chi^2 = 23.575$ 及 $\chi^2 = 17.632, P < 0.01$), 其中 A、B 两组均以移植 11~15 卵及 16~20 卵组得仔率较高。

3 讨论

从实验结果分析: 正常组以移植 1~5, 6~10, 11~15, 16~20 卵 4 组得仔率较高; 转基因组以移植 11~15, 16~20 卵两组得仔率较高。初步结论: (1) 单侧一次移卵 11~20 枚最好; (2) 转基因操作对受精卵影响大, 从而影响了小鼠的得仔率; (3) 移卵数量对生产率没有绝对影响。分析原因: 转基因组中移植 1~5 卵总体样本数太少, 可能影响结果的准确性; 在实际操作过程中, 当得到可移植卵数较少时, 一些存活状态不甚好的卵因不舍得舍弃而移入, 可能影响得仔率, 使得仔率有所降低。正常小鼠的产仔数为 8~15 仔^[2]。由于受精卵在接受体外操作中受到损伤不能百分之百成活, 当移入受精卵数 < 10 时, 随着受精卵的减员, 妊娠环境受影响而影响生产率和得仔率; 当移入受精卵数 > 20 时, 由于受精卵发育成体数超出其承受范围而影响妊娠过程, 从而影响生产率和得仔率。

[基金项目] 国家“九五”攻关项目(TJ99-LA01); 国家自然科学基金(39670811); 上海市科委基础研究重点项目(03DZ14023); 上海市科学技术发展基金(994919033)。

[作者简介] 李建秀(1962-), 女(汉族), 高级实验师。

* Corresponding author. E-mail: yphu@smmu.edu.cn

综上所述,建议在显微操作时,受体小鼠单侧输卵管内一次移卵 11~20 枚最好,数量少的就舍弃。

表 1 正常组及转基因组受精卵移植结果

分组	移植受精卵数(枚)	受体数		生产率(%)		移植受精卵总数(枚)		出生仔鼠(只)		得仔率(%)	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	1~5	12	5	33.3	20.0	57	22	10	2	17.54 ^{△△}	9.09
2	6~10	10	58	50.0	32.76	82	529	15	66	18.29 ^{△△}	12.48
3	11~15	10	82	50.0	57.32	130	1044	25	183	19.23 ^{△△}	17.53 ^{**}
4	16~20	10	82	60.0	62.50	189	577	37	95	19.58 ^{△△}	16.46 ^{**}
5	21~25	10	10	50.0	50.0	235	222	25	29	10.64	13.06
6	26~30	10	-	40.0	-	273	-	19	-	6.96	-

** $P < 0.01$ 与 B 组其他组比较; $\Delta\Delta P < 0.01$ 与 A 组其他组比较

[参考文献]

[1] 曾溢滔 主编. 遗传病的基因诊断与基因治疗[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999. 351-372.

[2] 黎怀星, 李建秀, 杨 桦, 等. 基于 pSPORT1 质粒的转基因小鼠

突变检测系统的建立[J]. 第二军医大学学报, 1998, 19(1): 9-12.

[3] 魏 泓 主编. 医学实验动物学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1998. 149-163.

[收稿日期] 2004-10-27

[修回日期] 2005-01-06

[本文编辑] 尹 茶

• 个案报告 •

原发性食管结核误诊为食管癌一例报告

Esophageal tuberculosis misdiagnosed as esophageal cancer: a case report

赵海华, 余永伟, 王彦丽(第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433)

[关键词] 食管; 结核; 食管肿瘤; 误诊

[中图分类号] R 571 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2005)03-0299-01

1 临床资料 患者女, 50 岁, 胸骨后疼痛、进行性吞咽困难 1 个月, 胃镜检查提示为食管癌, 活检标本未见肿瘤组织, 为明确诊断再次行超声胃镜检查, 胃镜所见: 食管距门齿 25~27 cm 右侧壁可见新生物生长, 食管腔无明显狭窄。超声所见: 病灶处食管壁正常结构破坏, 低回声病变已侵犯食管全层至纤维膜外, 病灶周围淋巴结肿大 0.6 cm×0.5 cm, 肺门部淋巴结无侵犯。胃镜诊断: 食管癌侵犯至浆膜层, 取活组织 5 块送病理诊断未见肿瘤组织; CT 诊断: 食管癌; 钡餐所见: 食管中段不规则龛影, 提示为食管癌。临床诊断食管癌, 全麻下行食管癌根治术, 术中见左肺与胸膜轻度粘连, 肿瘤位于主动脉弓后, 长约 3 cm, 纵隔淋巴结融合成团并固定无法切除, 于肿瘤上方 3 cm 处切断食管, 切除组织送检。病理检查: 切除食管一段, 长 7 cm, 周径 3 cm, 距上切端 1.5 cm, 下切端 6 cm 处见溃疡性肿物, 大小 1.5 cm×1.5 cm×1 cm, 切面灰白色; 镜下观察: 表面有溃疡形成, 其下有散在分布的上皮样肉芽肿, 其内有多核巨细胞; 另送检淋巴结 1 个, 直径 0.6 cm, 镜下见有小片状干酪样坏死, 周围有淋巴细胞及组织细胞, 抗酸染色可查到阳性细菌。病理诊断: 食管结核; 淋巴结结核。

2 讨论 食管结核较少见, 其中原发的食管结核报道很少, 即使在死于结核病的尸检的病例中, 食管结核的发病率仅为 0.04%~0.20%。其临床误诊率较高, 国内报道几乎 100% 误诊, 多误诊为食管肿瘤。造成误诊的原因多为食管

结核临床表现不典型, 结核中毒症状不明显, 多以吞咽困难和胸骨后疼痛就诊, 这与食管癌的症状基本一致; 影像学改变及胃镜检查与食管肿瘤也较相似, 胃镜取活检对食管结核的诊断帮助不大。本例患者曾两次胃镜, 但仍未确诊; 主要原因可能是取材较浅或取材部位黏膜未被累及有关。因此可用大号活检钳取深部组织送病理检查有助于诊断, 若术前未明确诊断者术中应送冰冻以便确诊。另外临床医生先入为主, 对其重视不够也是误诊的原因之一。本例患者既往无结核病史, 双肺 X 线检查未见原发灶, 无结核中毒症状, 临床表现主要是胸骨后疼痛和进行性吞咽困难, 胃镜检查有占位, 超声发现局部淋巴结肿大是其误诊的主要原因。因此诊断食管结核一定要注意以下鉴别点: (1) 食管结核临床症状类似食管癌, 但其吞咽困难程度往往同病变范围并不同步, 病变范围较局限, 但症状相对较明显, 可能与其病变周围炎症表现有关, 本例患者食管腔无明显狭窄, 但其吞咽困难很明显; (2) 对多次活检未见肿瘤组织者应考虑食管结核的可能性, PPD 皮试及血清结核抗体检查有助于诊断; (3) 食管结核的病理学抗酸染色检查阳性是诊断的主要依据。

[收稿日期] 2004-09-07

[修回日期] 2004-12-27

[本文编辑] 曹 静

[作者简介] 赵海华(1975-), 女(汉族), 硕士生。