

显微注射技术

傅 文 庆

(福建省仙游县中学)

显微注射技术是 50 年代发展起来的,现已广泛应用于细胞学和实验胚胎学等学科的研究。对于未来的农业和畜牧业,也有很大的应用价值。

此项技术最初用于细胞核的移植,方法是用显微吸管(也即显微注射针头)将细胞核吸入管内,再注射到去掉卵核的未受精卵内。

显微吸管最好用硬质玻璃管来拉。拉前将玻璃管在热的硫酸和硝酸的混合液内洗干净,再用蒸馏水彻底洗去酸液,这样可以使显微吸管内光滑,不会阻碍液体的进出。拉玻璃管时,先将玻璃管在酒精喷灯上局部烧熔,拉成内径为 1 毫米的毛细管,再将此毛细管在只有半颗黄豆大的酒精火焰上局部烧熔,拉成显微吸管。此时的显微吸管末端被封闭,要用眼科剪折断开口。把已开口的显微吸管置显微镜下观察,选适当口径者用之。

取半寸长的显微吸管装在一根橡皮管上,橡皮管的另一端和一条长的、内径约 1 毫米的小塑料管相连,小塑料管的另一端再用一段橡皮管和一显微注射针筒的头相接。在显微注射针筒的推动轴上安装一有力的弹簧。显微注射针筒的推动轴后面安一螺丝,用螺丝来使推动轴推进和退回,该螺丝可拆下显微镜的细调螺丝代用,显微注射针筒要用坚固支架固定。显微吸管也要加以固定,可拆下普通显微镜内升降架,显微吸管则固定在升降架上,用升降架的粗调螺丝来升降显微吸管,以便使显微吸管刺进细胞和退出细胞。整个显微注射系统内部灌满油类物质(如石蜡油、硅油等),这样便于准确控制显微吸管内的压力。

吸核的方法并不是将显微注射针头刺入供

体细胞内吸取细胞核,而是将整个供体细胞吸入显微吸管内。因此,显微吸管口径要小于供体细胞直径,最好与供体细胞直径成 1:2 到 1:4 的比例,这样可使供体细胞破裂,但细胞质不会太分散,以便保护细胞核免受损伤。

供体细胞可选用任一发育阶段的胚胎细胞,也可选用成体特定组织的已分化的体细胞。

受体细胞一般为与供体细胞同种或异种的两栖类或鱼类的未受精卵。注射前用细玻璃针在靠近第二极体的地方刺入卵内,再往上挑,使少量的细胞质流出,卵核即包含在流出的细胞质中。这样挑出的细胞质有一条细胞质细丝与卵子相连,须割断。这样处理过的卵即为去核卵。去核的另一种方法是用一定剂量的 X 射线或紫外线将卵核杀死。

去核的未受精卵即可用于接受显微注射,即在双筒显微镜下将显微注射针头(即显微吸管)刺入去核卵的中心,把上述显微吸管内的细胞核连同核周围的细胞质一起轻轻地注入卵内。抽出显微吸管后,把受过手术的卵移到培养液中培养,进行胚胎发育。

两栖类和鱼类的卵体积大,进行细胞核移植手术较简单,容易获得成功。哺乳动物的卵体积较小,进行细胞核移植极其困难。但目前显微注射技术已有很大改善,已能用于较小的细胞移植细胞器。下面是对较小细胞进行细胞器移植的一架显微注射装置(图 1, 图 2)。

整个显微注射装置主要包括两个系统:注射系统和制动系统。利用双筒显微镜观察注射情形。显微镜照明座上夹一操作台,操作台具有 $25 \times 20 \times 5$ 厘米大小的湿室,上盖以 22×40 厘米的玻璃片。注射样品(供体细胞的细胞

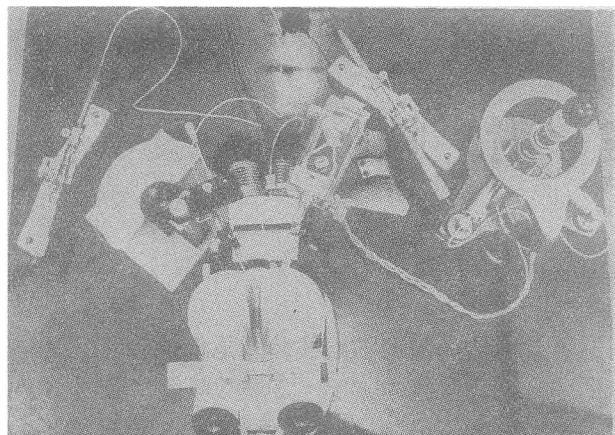


图1 显微注射外貌图

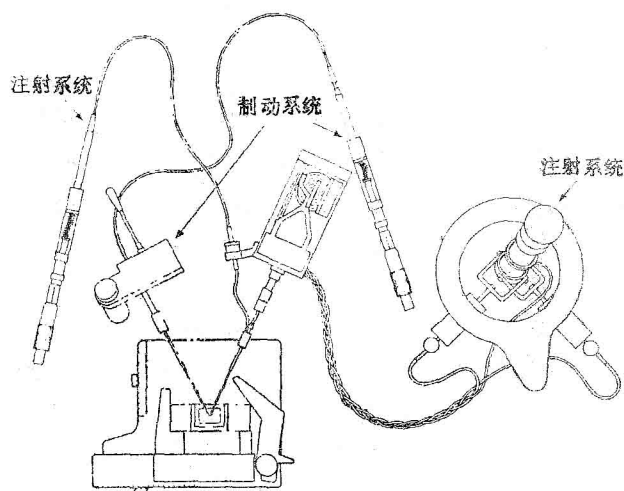


图2 显微注射解剖图

器制备物和受体细胞)则置于玻片上。

注射系统同用作细胞核移植的装置大同小异,包括一个50微升的显微注射针筒,一条内径约1毫米的塑料管和一个显微注射针头。注射针头末端内径一般为3微米,并在距末端5毫米处烧弯成一定角度。拔掉注射针筒推动轴,使注射针头朝上,往注射针筒灌进油类,然后压进推动轴,使气泡从注射针头中排出。

为了更好地控制液体流出显微吸管的速度,还可以在靠近显微吸管的末端造成一狭窄处(图3)。方法是使一支玻璃显微吸管水平地通过白金丝环(在显微镜下利用显微操作器进行)。使电流通过白金环,显微吸管的这一部分便被加热并加厚,形成了一个狭窄处。如须防

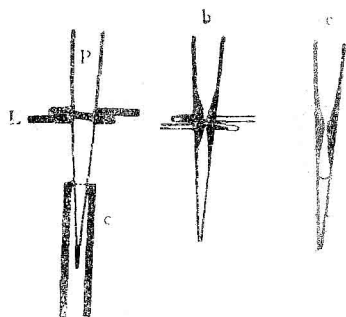


图3 使显微吸管壁局部加厚的方法

L——白金丝环;P——显微吸管;c——毛细管

止吸管末端因重力和过热而弯曲,可使吸管的末端支撑于一条固定在显微镜载物台上的毛细管中。

制动系统在不用时灌注酒精以保证无菌,使用前须用蒸馏水把酒精洗净。制动系统内灌满“制动液”,“制动液”可以选用含有2毫克/毫升的牛血清白蛋白的Dryl溶液。

整个显微注射装置放置在坚固基座上并垫橡皮防震,各系统也须用金属支架固定牢固。最好有一间能容纳显微注射装置、显微镜等物和便于操作的小房间。小房间的室温保持在18℃,因为在太高的温度下进行注射,细胞很容易破裂。

现以对草履虫注射不同品系草履虫的提取液(只含线粒体)为例,说明上述显微注射装置的法。在进行显微注射前,把草履虫放在“制动液”中。把只含线粒体的不同品系草履虫的提取液滴在玻片中央,把一小悬滴只含一个草履虫的“制动液”放在只含线粒体液体的周围玻片上。用注射系统吸取适量的含线粒体的液体。用制动系统吸干小悬滴中的液体,使草履虫在玻片上不动。把显微镜调至适当倍数观察注射情况。把注射针头迅速刺进细胞。当看清注射针头已刺入细胞时,轻轻地推出含线粒体的液体。通常可观察到从注射针头流出的液体置换细胞中细胞质的情形。迅速抽出针头,从制动系统向受过手术的草履虫注给一滴“制动

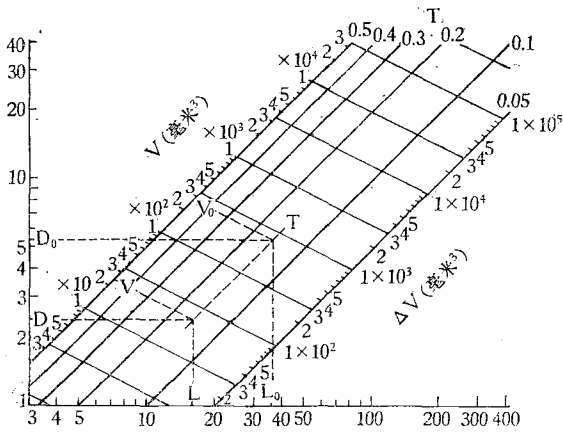


图4 测定显微吸管中液体容积的图解

D ——底边内径； L ——圆锥体的高度； T ——圆锥体底边内径与圆锥体高度之比； V ——圆锥体容积

液”以释放它。再把受过手术的草履虫移到培养液中置18℃过度。显微注射装置用完以后留在注射针头内外的任何物质都须清洗干净。至于进出显微吸管的液体容积，可用图4的图解来测定。

$T = (D_0 - D)/\Delta L$ ， D_0 和 D 分别代表注射前后吸管的内径， ΔL 是在注射前后液面位移的距离。 D 和 L 都可以用目镜测微计测定。被排出吸管的液体的容积为 $V_0 - V$ ，可以根据 T 线从图解上找到。

受体细胞的生理状态和细胞生长液的表面张力对显微注射的成败有很大的影响。因此，在注射前须应用减少表面张力的“制动液”。“制动液”的应用可以大大简化显微注射手续，使得能在单位时间内成功地注射更多的细胞。

注射针头和玻片之间的角度对于注射成败也有一定影响。如果角度太小，针头不能刺进细胞；如果角度太大，注射针头往往刺穿细胞，使注射液从细胞的另一边流出。最适角度视具体情况而定，以注射草履虫为例，一般与水平面成12—18度为佳。

如果接受注射的细胞表面弹性很大，或者韧度大，要成功地把注射针头刺入细胞，有时是相当困难的。这一困难可以用图5那样的压电装置来解决。

显微吸管(P)外壁由一压电弯曲物质(B)

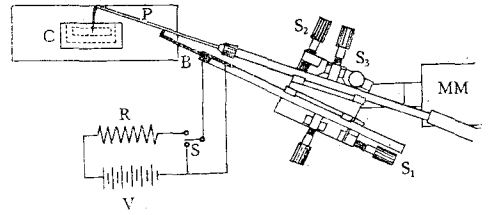


图5 迅速推入显微注射针头的装置

B ——压电弯曲物质； MM ——显微操作台；
 P ——显微吸管； R ——电阻； S ——开关；
 S_1, S_2, S_3 ——调节螺丝； V ——直流电源

支撑着， B 与 P 的相对位置可由螺丝(S_1, S_2, S_3)来调整。压电弯曲物质(B)被高电压所弯曲，如使 B 末端突然短路， B 则迅速地从 P 移开。 P 失去支撑力，迅即降下，这样可以产生很快的推刺速度，很容易刺入受体细胞。

显微注射技术应用以来，取得了不少的成就。在两栖类和鱼类方面细胞核移植获得成功，说明了体细胞的细胞核完全能代替生殖细胞的细胞核，使胚胎正常地发育到成体。特别是最近有人成功地证明：成体已分化的细胞，例如肠、肾、肝、红血球(两栖类和鱼类的红血球是有细胞核的)的细胞核，也能代替生殖细胞的细胞核，使胚胎正常发育。这就是说，在胚胎发育过程中，细胞的分化并不使其细胞核内遗传物质遭受质的变化，其细胞核内遗传物质仍然保持其完整性，已分化的细胞的遗传物质大部分没有得到表现，这并不是丢失或“残废”，可能只是暂时被某种物质所“封闭”。被“封闭”了的遗传物质在一定条件下可以重新被“打开”，从而重新发挥它的功能。

最近有人报道：草履虫对红霉素的抗性，可以从抗红霉素品系提取的线粒体，用显微注射的方法转移到对红霉素敏感的细胞；线粒体转移抗红霉素的性能不被DNA酶或RNA酶所影响，但可以完全被低浓度的非离子去垢剂所除去。这一证据表明，对红霉素抗性的决定因素定位在线粒体中，很可能是定位在线粒体的DNA中。

显微注射技术的应用前景十分广阔。一旦这一技术在植物细胞和哺乳动物细胞方面应用

(下转第46页)

特异位。这种特异位,称为外来抗原表位在识别系统内部的内象。当淋巴细胞因受外来表位刺激而增殖时,具有这种内象的淋巴细胞也接着受到影响。这样一环接一环地影响着,在淋巴细胞抗体的功能网内,产生一识别波(Recognition wave)(图 11)。

随着个体生命的发展,外来的表位、身体内部各种组织的细胞膜表面出现的新的表位,不断地撞击着这功能网,引起一次又一次的不同的识别波。这样使具有某些对位或某些特异位的淋巴细胞增多一些,而另一种减少一些;识别系统的固有动态就这样变化发展着。

九、识别系统与神经系统

识别系统与神经系统是身体内唯一能对大量不同的信号起相应反应的系统。这两种系统,都是既能接受又能传送信号。这些信号都是对细胞既可引起兴奋,又可引起抑制。这两个系统都遍及全身各部分;但这两个系统本身,都互相回避。识别系统淋巴细胞与神经细胞间有血脑屏障间隔着;两个系统彼此不直接相接触。

神经细胞是定居于脑、脊髓、及神经节内。神经细胞有长的突起;在整个神经系统内,一个神经细胞的轴突末端与另一神经细胞的细胞体或树突相接,以这种方式相连成一神经细胞网。

淋巴细胞可在全身流动循环。在身体内淋巴细胞的数目比神经细胞大 100 倍。淋巴细胞间没有长的突起互相连接;但在细胞膜表面有抗体(受体),并产生出游离的抗体。有人认为,全身淋巴细胞抗体,以一抗体的对位识别另一相应抗体的特异位,成一淋巴细胞网。

识别系统与神经系统都具有接受外来信号

的作用,而改变其网状结构的动态。这是对外界的适应。这两个系统对曾经历过的经验,都能形成记忆。这记忆都可以经过加强而长久保持。但不能传给下一代。

十、结 语

在身体内由淋巴细胞及其产物抗体构成识别系统。识别系统不断地对体内各个细胞的 DNA $\rightarrow$ RNA $\rightarrow$ 蛋白质,及 DNA $\xrightarrow{\text{复制}}$ DNA 工作进行核查。识别系统可识别各种“非己”的细胞及大分子物质。

“对立统一规律是宇宙的根本规律”。一切事物都是一分为二的,识别系统也完全是这样。淋巴细胞分两类: T 淋巴细胞与 B 淋巴细胞。这两类细胞,既互相协作,又互相拮抗。淋巴细胞表面有抗体(受体);这抗体的对位与相应的表位接触后,淋巴细胞既可出现兴奋状态,也可出现麻痹状态。淋巴细胞抗体既有对位能识别表位,淋巴细胞抗体本身又有表位(特异位)而被别的淋巴细胞抗体的对位所识别。

因此,目前有人提出了这样的假说:全身每一个淋巴细胞不是孤立存在的,整个身体的淋巴细胞构成一功能性的网状结构——淋巴细胞网,它具有“固有动态”。当有外来表位侵入,或身体内部产生新的表位时,在淋巴细胞网产生识别波。

目前,对辨别“自己”与“非己”的识别系统的研究,还处于萌芽时期。关于“对位”怎样识别“表位”、淋巴细胞兴奋与麻痹的本质是什么等等许多问题,仍然不清,其中有些问题还处于学说、假说阶段。同任何科学的发展一样,随着科学实验的不断发展,许多学说、假说必将为新的所替代。

(上接第 37 页)

成功,那么将有可能把一个物种的各个品系的所有优良品性集中起来,培育出完全崭新的、更优良的动、植物品种。

但是值得注意的是,目前苏修叛徒集团为

其政治需要,利用他们的御用文人鼓吹把天才的体细胞核移植到任何妇女的卵细胞里,将复制出任意数量的天才,来大肆宣扬所谓“天才论”,这是十分反动与荒谬的,值得我们注意并需要加以批判的。