

文章编号: 0490-6756(2002)05-0934-04

利用低强度脉冲电磁场对家猪精子电穿孔的研究

王小行¹, 彭 勇¹, 王子淑¹, 王保义², 张 弘², 刘长军²

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 四川大学无线电系, 成都 610064)

摘要: 用低强度脉冲电磁场对家猪精子细胞进行电击处理, 发现台盼蓝染料能够进入细胞, 而且通过扫描电镜可以观察到细胞膜表面有明显的孔洞. 这证实了低强度瞬态电磁场能够引起猪精子细胞电穿孔和促使外源物质进入细胞内.

关键词: 低强度脉冲电磁场; 精子; 电穿孔

中图分类号: Q 27 **文献标识码:** A

以精子为载体将外源 DNA 导入后代, 有可能简化转基因动物的生产. 目前, 以精子载体法介导的外源基因转移的方法有多种, 电击法是促进 DNA 与动物精子结合的方法之一. Horan(1991)^[1]发现电击法能提高猪精子对 DNA 的摄取量, Nakanish 等(1993)^[2]在禽类也获得了类似的结果. Gange 等(1995)^[3]发现电脉冲可以使牛精子摄取 DNA 的量增加 5~8 倍, 体外受精后经 PCR 技术分析, 有 22% 的胚胎携带有外源基因. 国外有少数关于用电击法促进 DNA 与动物精子结合的报道, 但未见用此法成功获得转基因动物后代的报道. 国内还未见相关研究的文献. 国外所用的电击法都是采用高压电场使精子质膜的通透性产生暂时可逆性变化, 从而使 DNA 分子进入精子细胞内. 我们采用低强度脉冲电磁场处理猪精子细胞, 它的优点是场强低, 对活细胞的损害小, 处理后精子细胞的成活率高, 因此潜在的实用性更强.

1 实验方法

1.1 实验装置及其条件

1.1.1 实验系统 脉冲电磁场选用 MFD-1A 型毫微秒脉冲发生器, 其脉冲波形近似为矩形. 在实验中采用脉冲电压 187V, 脉冲宽度为 10^{-7} s, 重复频率为 300Hz. 实验时, 样品置放于宽频带横电磁传输室(BTEM Cell)中, 在输入电压为 187V 时, BTEM 室内样品处的峰值场强为 20V/cm. BTEM 装置带有恒温装置, 在实验过程中, BTEM 室内的温度控制在 37℃^[3~5].

1.1.2 试剂 精子稀释液: 丁维葡萄糖 5g, 柠檬酸钠 0.5g, 青霉素 10000(IU), 链霉素 10000(μ g), 三蒸水 100mL. 电穿孔缓冲液: 200mmol/L 葡萄糖, 5mmol/L 硫酸镁, 2mmol/L 巯基乙醇和 20mmol/L Tris-HCl(pH 值 7.6).

1.2 方法

1.2.1 精子的洗涤 将长白猪精液(取自四川省畜牧研究所)与精子稀释液等体积混合, 500r/min 离心 5min, 取其上清液再以 1000r/min 离心 5min, 又取其上清液以 1500r/min 离心 8min, 收集精子. 取上清液, 1500r/min, 离心 8min. 加入精子稀释液, 2000r/min, 离心 8min, 共 2 次. 弃上清液, 加入 3mL 等渗低电导液, 混匀, 分装于青霉素小瓶中, 每瓶 0.4mL.

1.2.2 电磁场作用下台盼蓝(TryPan Blue)渗入精子的实验 将分装后的青霉素小瓶放于 BTEM 室内, 照表进行处理. 用精子稀释液进行洗涤, 1500r/min 离心 8min, 重复几次, 直至洗去溶液中残存染料为止. 加血清制备悬液、涂片, 甲醇固定, 显微镜观察, 照相.

收稿日期: 2001-07-30

基金项目: 国家自然科学基金(60071024)

中国知网 <https://www.cnki.net>

表 1 台盼蓝渗入实验的照射处理方法

实验样品组号	1	2	3	4
处理方法	不加台盼蓝 不照射	加台盼蓝 不照射	加台盼蓝 照射 20min	加台盼蓝 照射 60min

1.2.3 精子的扫描电镜观察 将分装后的青霉素小瓶放于 BTEM Cell 内,照表 2 进行处理.将精液滴于铺有 Formvar 膜的盖玻片上,用戊二醛固定 24h,PBS 洗涤两次;钨酸固定 4h,PBS 洗涤两次,用 50%,70%,90%的梯度丙酮逐级脱水一次,100%丙酮两次;再用 50%,70%,90%的梯度醋酸异戊酯逐级脱水一次,100%醋酸异戊酯两次;临界点干燥,真空镀金,扫描电镜观察,照相.

表 2 精子扫描电镜实验的电磁场处理

编号	处理时间 (min)	处理结束前 5min 加戊 二醛的量(mL)	结束后加戊二醛的量 (mL)
0	0	0	0.4
1	20	0.1	0.3
2	20	0.2	0.2
3	20	0.3	0.1
4	60	0.1	0.3
5	60	0.2	0.2
6	60	0.3	0.1
7	80	0.1	0.3
8	80	0.2	0.2
9	80	0.3	0.1
013	0	100	0.1
11	100	0.2	0.2
12	100	0.3	0.1

2 实验结果与讨论

2.1 台盼蓝渗入精子的实验

在显微镜下观察,对照组的精子头部呈淡蓝色,尾部的颜色较深,但头部内并无深蓝色的颗粒存在;而在经照射 20min 和 60min 的精子头部均可发现有深蓝色的染料颗粒存在.说明低强度瞬态电磁场使猪精子细胞膜发生了穿孔,台盼蓝颗粒得以通过膜上的电致孔洞进入精子细胞.我们在显微镜下进行了统计:经照射 20min 的精子细胞电穿孔率约为 0.35%,照射 60min 的精子细胞电穿孔率约为 0.54%.见图 1.

台盼蓝是一种相对分子质量为 960Da 的小分子物质,它不能穿透活细胞的质膜进入细胞,因此活细胞对台盼蓝是拒染的.在低强度瞬态电磁场处理后,发现精子细胞质膜的通透性发生了改变,质膜上产生了电致孔洞,台盼蓝才得以进入细胞.台盼蓝虽然可以使死细胞着色,但着色是弥散性的深蓝色,它与台盼蓝通过电穿孔进入细胞是有明显区别的.在低强度脉冲电磁场作用下,台盼蓝通过精子膜上的电致孔洞进入细胞,几乎不会导致精子的死亡.这对实际用电穿孔精子介导外源基因的转移和生产转基因动物提供了一种有价值的候选途径.

2.2 精子细胞的扫描电镜观察

在照射 20min 预加 0.1mL 戊二醛,照射 100min 预加 0.2mL 戊二醛和照射 100min 预加 0.3mL 戊二醛这 3 组样品中发现精子细胞有明显的穿孔现象,但是穿孔几率都很小,我们估计实际的穿孔率在 1%以下,在其它组中未发现有明显的穿孔现象.电穿孔发生于精子的头部,孔洞非常明显,孔洞直径范围为 0.2~0.7μm 不等,孔洞形状不规则(图 2).用低强度瞬态电磁场处理精子细胞后,通过扫描电镜观察到精子表面有直径 0.2~0.7μm 大小不等的孔洞,电致孔洞的大小足以允许外源 DNA 进入,对电击法促使外源 DNA 导入精子内提供了一种合理的解释.因为电穿孔在细胞膜上产生的孔洞是可逆的,它能自我修复.在电磁场作用时,采用在照射结束前 5min 加入一定量的戊二醛溶液进行预固定,在照射结束后再加一定量的戊

二醛进行固定,可以有效地捕捉到电磁场作用在细胞膜上产生的动态穿孔.

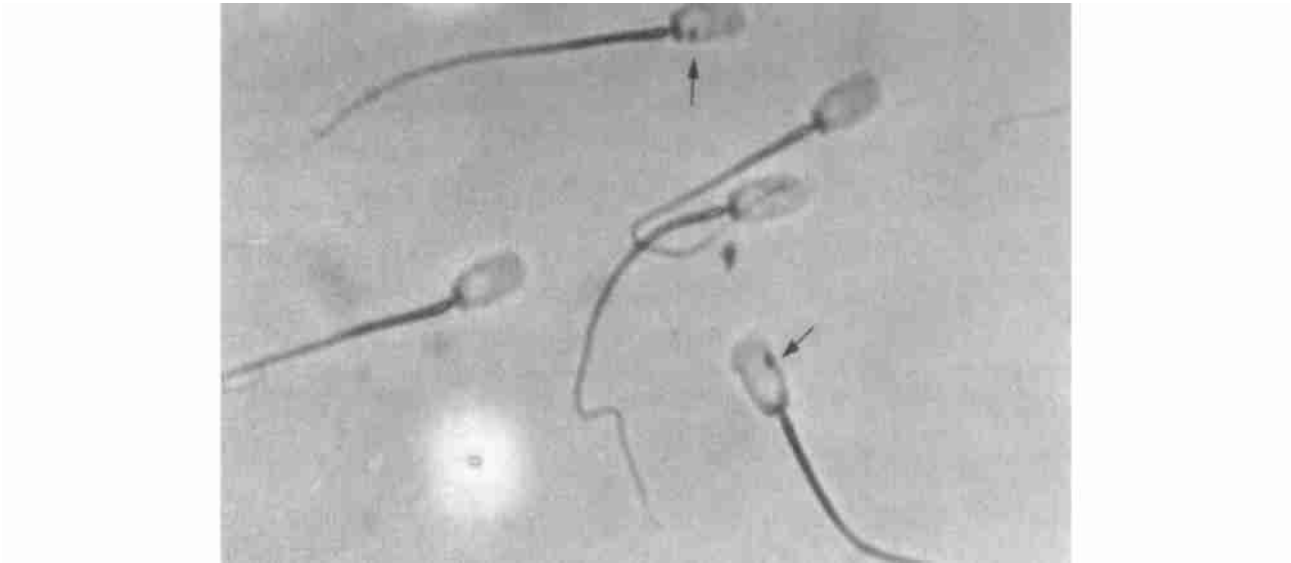


图 1 台盼蓝颗粒通过膜上的电穿孔洞进入精子细胞



图 2 精子细胞的扫描电镜观察

a. 照射 20min,加 0.1mL 戊二醛预固定; b. 照射 100min,加 0.2mL 戊二醛预固定;
c. 照射 100min,加 0.3mL 戊二醛预固定

2.3 影响电穿孔效率的因素

电穿孔效应是脉冲电磁场非热效应的重要研究领域之一. 电穿孔(Electroporation)是在一定参数的电场作用下在细胞膜脂双层上形成孔洞,从而导致膜局部区域的扰动和通透性的提高,对多种离子、分子产生通透性. 在一定的条件下,这种膜的变化是可逆的,并且细胞可以继续存活. 影响电穿孔的因素很多,如电场的强度、脉冲数目、脉冲宽度、照射时间等. 我们仅只对照射时间和戊二醛量对电穿孔效率的影响做了研究.

在台盼蓝渗入实验中,照射 20min 的精子细胞电穿孔率约为 0.35%,照射 60min 的精子细胞电穿孔率约为 0.54%. 统计学分析表明两组间没有显著性差异,这提示电场照射时间对台盼蓝的渗入量影响不大. 电镜样品组作了众多不同处理的样品的组合,确定处理时间和戊二醛加入量的搭配以达到最佳的实验

效果. 观察时搜索了大量的细胞, 在照射 20min 预加 0.1mL 戊二醛, 照射 100min 预加 0.2mL 戊二醛和照射 100min 预加 0.3mL 戊二醛这 3 组样品中发现细胞有明显的穿孔现象, 其他组中没有发现有穿孔. 我们认为这是瞬态固定、小概率穿孔事件造成的.

2.4 应用前景和展望

目前应用精子载体转基因技术来研究转基因动物的生产是一个热门课题, 促进 DNA 与动物精子的结合一般采用共孵育法^[1]、脂质体法^[7]和电击法. Horan(1991)^[1]发现电击能提高猪精子对外源 DNA 的摄取量, Nakanish 等(1993)^[2]也发现电击法能提高禽类精子对外源 DNA 的摄取量. 电击法是促使外源 DNA 与动物精子结合的方法之一, 但传统的电击法都是采用高压电场, 而我们采用的是低强度瞬态电磁场, 因其场强低(峰值场强为 20V/cm), 对细胞的损害小, 成活率高, 因此更具有实际应用价值.

参考文献:

- [1] Horan R, *et al.* Arch Androl, 1991, 26: 83—92.
- [2] Nakanish A, *et al.* Mol Reprod Dev, 1998, 50: 406—409
- [3] Gange M B, *et al.* Meth Mol Biol, 1995, 48: 181—166.
- [4] 王保义, 杨杰斌, 郭庆功, 等. 毫微妙电磁冲的生物效应实验研究和机理分析[J]. 中国科学·C 辑, 1997, 27(1): 36.
- [5] Song T Y. Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection II [J]. Biophysical Journal, 1990, 58(10): 897
- [6] Huang Kama, Liu Yongqing. A simple method for calculating electric and magnetic field in GTEM cell[J]. IEEE Trans • EMC 1994, 36(4): 335.
- [7] Rottmann O J, *et al.* Proc. 5th World Congress Genetics Applied to Livestock Production, 1994, 347—251.

Study on the Effects of Electroporation of Domestic Pig Sperm Cell Induced by Weak Electric-Magnetic Pulse Field

WANG Xiao-xing¹, PENG Yong¹, WANG Zi-shu¹, WANG Bao-yi², ZHANG Hong², LIU Chang-jun²

(1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Department of Radio-electronics, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: The sperms of domestic pig were treated with weak electric-magnetic pulse field. The authors observe that Trypan blue can enter the sperm cells and there are obvious holes in the cell surface. It confirms that weak electric-magnetic pulse field can cause electroporation of domestic pig sperms and make the little exogenous molecules enter the sperm cells.

Key words: weak electric-magnetic pulse field; sperm; electroporation