

哺乳类动物减数分裂标本的简易制作方法

蔡有余* 吴旻**

(中国医学科学院实验医学研究所)

减数分裂过程普遍见于行有性繁殖的动、植物性细胞,是使遗传单位(基因)在亲、子代之间得以进行重新分配的主要机制,因此,研究减数分裂是理解动、植物遗传的染色体基础的一个先决条件。性细胞对电离辐射、化学诱变剂(包括许多药物)和某些病毒的作用十分敏感。当前,环境中各种诱变因素的不断增加,它们对生物,尤其是人类可能产生的遗传效应,已愈益引起广泛的关切。检查减数分裂可以直接观察性细胞中遗传物质的受损情况。

哺乳类动物减数分裂标本的制作比较繁复,且不易获得十分令人满意的结果^[1-3]。故近廿年来尽管哺乳类动物体细胞染色体的研究得到了长足的进展,有关减数分裂的研究却直到近几年来才逐渐引起较多的注意。国内至今尚未见到这方面的报道。我们于1964年建立了一种简单而可靠的方法,检查了几种常用实验动物和一种北京郊区产的啮齿动物大仓鼠的减数分裂,均获得了满意的结果,似较目前国外广泛采用的方法更为简便。现将操作过程介绍如下。

材 料 和 方 法

材料:健康的、性成熟的雄性黑线仓鼠(*Cricetulus griseus*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、小鼠(*Mus musculus*)、金仓鼠(*Mesocricetus auratus*)和大仓鼠(*Cricetulus triton*)。

方法:

1. 取睾丸前二小时先给实验动物经腹腔注入适量秋水仙素(约2微克/1克体重)。
2. 在苯巴比妥麻醉下或处死动物后立即取出睾丸一个,投入2%枸橼酸钠溶液内,洗去血液,移入盛有10毫升上述溶液的小平皿,剪开白膜,用解剖针和小弯镊夹出曲细精管,除去脂肪和结缔组织,将曲细精管和溶液移入乳钵内,用锐利的小剪刀将曲细精管剪碎成1毫米左右的短管,随即用瓷杵研磨5—10分钟。研磨时速度和用力要均匀适度,速度太快或用力过大则细胞碎裂,反之,用力不足或速度太慢则不能将细胞从曲细精管中压出,都将影响标本的质量。我们的绝大多数标本是用这种研磨法制作的。

如将上述剪碎之曲细精管悬液移置一小烧杯内,加入一铁心小玻棒,置电磁搅拌器上搅拌7—10分钟(每分钟转速为500—700转),也能得到相应的细胞悬液。

3. 将上述研细的睾丸组织悬液注入锥形离心管,以200—300转/分离心3—4分钟,使块状组织沉底,用吸管吸取中层的细胞悬液2—4毫升,移置另一刻度离心管内,加入等量蒸馏

本文1978年2月24日收到。

* 现在中国医学科学院分院工作。

** 现在中国医学科学院肿瘤研究所工作。

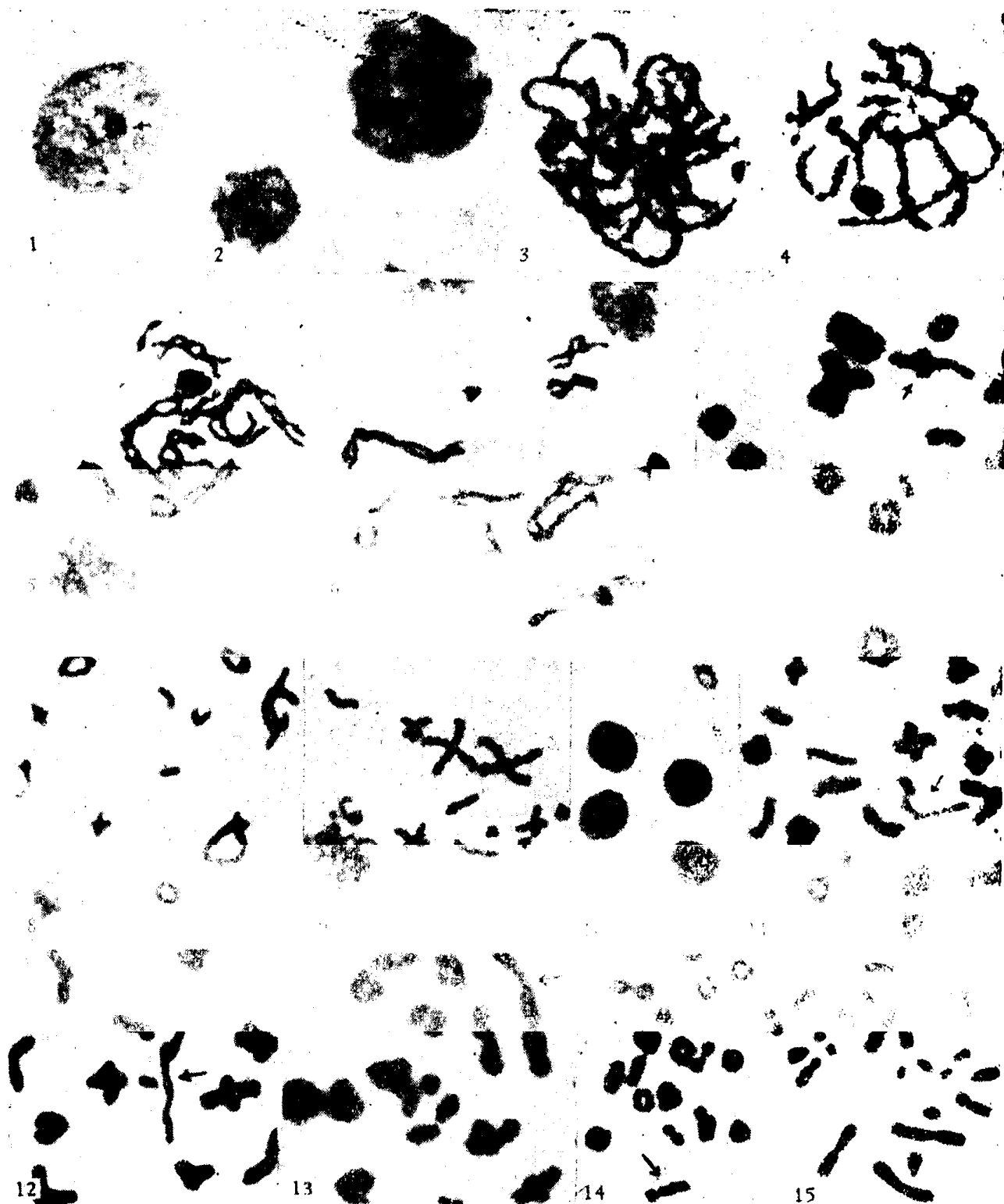


图 1-1—10 示黑线仓鼠减数分裂各个时期。图 1-1 为间期的初级精母细胞核，箭头示核仁。图 1-2 为细线期 (Leptotene)，染色丝隐约可见，杂乱无章，核仁靠近边缘。图 1-3 为合线期 (Zygotene)，染色体呈放射状的花束样排列，缩短变粗，同源染色体开始配对，如箭头所示。图 1-4 为粗线期 (Pachytene)，染色体完成配对，并变得更加粗短；此时的染色体称双价体，个别地方仍能看出两条平行的单价体，各箭头所示。图 1-5 为前双线期 (Prediplotene)，两条染色体呈螺旋状结构，形成多个交叉，核仁仍未消失。图 1-6 示双线期 (Diplotene)，核仁消失为其特征，交叉数因端化而较前双线期减少。图 1-7 为终变期 (Diakinesis)，或称浓缩期，交叉数更加减少，X 和 Y 染色体呈部分并列连接，即 X 和 Y 的末段之间配对形成中间交叉 (Interstitial chiasma)，如箭头所示。图 1-8 为终变期后期 (Distal diakinesis)，端化继续进行，X 和 Y 的末段并列连接消失，染色体更加浓缩成棒状。图 1-9 示第二次减数分裂中期，染色体已减半为 11 个。图 1-10 示四个精子核。图 1-11 示大鼠的减数分裂终变期，箭头示 X 和 Y 染色体末端连接。图 1-12、13 和 14 各示大仓鼠、金仓鼠和小鼠的减数分裂终变期。箭头均指示 XY 二价体。图 1-15 示黑线仓鼠睾丸内的有丝分裂中期染色体

水,置 37℃ 水浴中低渗处理 20 分钟。

4. 以 500—700 转/分离心 5 分钟,吸去上层清液,得细胞沉淀。

5. 加入新配制的 3:1 甲醇冰醋酸固定液 3—4 毫升,5 分钟后,用小吸管将细胞团块轻轻翻转,再过 15—20 分钟后,用小吸管将细胞团块轻轻打散。

6. 再次低速离心 5 分钟,吸去上层固定液,另加入新配制固定液少许,用小吸管打匀成较浓的细胞悬液。

7. 用我们的常规空气干燥法制片^[4]:从冰水中取出一张干净无油的载片,滴 1—2 滴细胞悬液于其上,立即轻轻吹气,使细胞迅速分散,并在酒精灯上稍稍加热烤干。

8. 用 Giemsa 染液(用 pH7.2 磷酸缓冲液配制,每毫升加一滴 Giemsa 母液)染色 30—40 分钟,自来水冲洗 3—5 次,蒸馏水冲洗 3 次,晾干后透明树胶封片即成永久标本。

9. 后来发现,不注射秋水仙素,也能得到同样清晰的减数分裂各期图像。

结 果 和 讨 论

同国外目前采用的几种方法比较,我们的方法具有若干优点。

首先,我们的方法程序简单,易于掌握,不需特殊的设备和试剂,在一般实验室内均可进行。国外在六十年代初期以前均采用压片法,手续繁复,且不能制得永久标本。Evans 等人虽然采用了空气干燥法制片,废除了压片程序,并使标本质量大为提高,因而至今为各实验室所采用,但仍须在解剖显微镜下逐个挤出曲细精管内的细胞,费时多,收获的细胞数甚少。我们用剪碎和研磨的方法可以迅速获得大量细胞,制作许多标本。

其次,国外的方法往往要在低倍镜下筛去大多数没有分裂像的片子,Evans 等人的标本中主要为终变期染色体,其它各期均较少见。而我们的标本中,不但每张片子都有足够数量的可供分析的分裂像,而且各期均有,甚至还可见到有丝分裂像。因此,在检查双线期的交叉数(用于估算基因组的遗传长度和结构基因数目)^[5]、研究配对行为和确定染色体缺失、重复、倒位、易位等畸变类型等方面可能成为一种有用的手段。

参 考 文 献

- [1] Ohno, S. & Weller, C., *Chromosoma*, 13(1962), 106.
- [2] Welshons, W. J. et al., *Stain Technol.* 37(1962), 1.
- [3] Evans, E. P. et al., *Cytogenetics* 3(1964), 289.
- [4] 吴 旻,凌丽华,天津医学杂志,输血及血液学附刊 2(1964), 1:53.
- [5] Mckusick, V. A. Ruddle, F. H., *Science*, 196(1977), 390.