

小鼠卵母细胞减数分裂染色体的制备

李朝军 袁来平^① 张锡然 陈宜峰

(南京师范大学生物系, 南京 210097)

Preparation of Meiotic Karyotype of Mouse Oocyte

Li Chaojun Yan Leiping Zhang Xiran Chen Yifeng

(Biology Department of Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

哺乳动物的卵母细胞的减数分裂过程中存在两次自发的停滞现象, 第一次是在第一次减数分裂前期的双线期, 这一静止期持续很长时间, 一直到动物性成熟后卵母细胞进入发育周期, 在促性腺激素的作用下, 卵母细胞的第一次减数分裂才重新启动。完成第一次减数分裂后, 又停滞在第二次减数分裂的中期, 在精子或化学因素刺激的作用下, 完成第二次减数分裂⁽⁴⁾。因此, 对哺乳动物的卵母细胞在一定条件下进行培养, 可制备减数分裂过程中各时期染色体的标本, 尤其是两次减数分裂中期染色体的制备尤为方便。并通过显示 C 带进一步确定染色体的数目, 可用于研究体外培养条件下各种因素对卵母细胞染色体的影响。

1 材料与 方法

1.1 卵母细胞的获取和体外培养

取 19—22 日龄的雌性昆明系小鼠, 用 5IU / 只孕马血清激素处理以促进卵泡发育。48 小时后, 颈部脱位法处死小鼠。将卵巢置于 M_2 培养液中, 在实体解剖镜下除去输卵管及附着的脂肪, 用小号针头穿刺有腔卵泡, 轻轻挤压, 外面包围有卵丘细胞生长完全的卵母细胞从卵泡中逸出。用玻璃吸卵管将卵母细胞一一移出, 置于 M_2 培养液中, 用略小于卵母细胞直径的吸卵管轻轻吹打卵母细胞, 将外面的卵丘细胞去除。将卵母细胞置于覆盖有石蜡油的微滴中, 于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 的湿度饱和培养箱中培养, 培养液为 $\text{DMEM}+4\text{mg/ml}$ 牛血清白蛋白。

1.2 中期 I 和中期 II 染色体的制备

培养 18—20 小时后, 卵母细胞自发停滞于第二次减数分裂的中期。用链蛋白酶 E 处理去除透明带, 将第一极体去除, 以避免极体内染色体的干扰。若要得到第一次减数分裂中期相, 可在培养液中加 $0.2\mu\text{g/ml}$ 秋水仙素使卵母细胞停止在第一次减数分裂的中期。

制备中期 I 染色体时, 卵母细胞可在双蒸水中低渗处理 30—40 分钟(去除透明带的中期 II 卵母细胞可在 1% 的柠檬酸钠中低渗)。用吸卵管吸取低渗较好的卵母细胞于干净载玻片上, 当溶液快干前, 在解剖镜下将 $3:1$ 的甲醇:冰醋酸滴入固定, 固定几次后更换为 $1:1$ 甲醇:冰醋酸。空气干燥后, Giemsa($1:9$)染液扣染 30 分钟, 自来水冲洗数秒, 晾干后观察。

1.3 染色体 C 带的制备

取片龄在 1 周左右的染色体玻片标本, $3:1$ 的甲醇:冰醋酸固定液褪色 1 分钟。在 0.2mol/L 盐酸溶液中室温处理 30 分钟, 除去非酸性蛋白质。蒸馏水清洗后, 于 52°C 的 5% 的 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 水浴中处理 6 分钟到 8 分钟左右, 于 60°C 的 $2\times\text{SSC}$ 溶液中处理 2 小时, 清洗后用 3% 的 Giemsa 染液染色 15 分钟, 观察⁽¹⁾。

^①91级本科生, 现工作单位: 江苏省如皋市搬经中学。

2 结果与讨论

国内有关哺乳动物减数分裂染色体的研究,大多集中在雄性动物⁽²⁾,可能是因为雌性动物的染色体制备相对困难的缘故。本研究的目的就在于建立一个相对简单易行的卵母细胞减数分裂染色体的制备方法。实验结果如图 1 所示,图 1a 为 MI 晚期的分裂相,表现出 20 对同源染色体相互配对的现象。由于小鼠是端着丝粒染色体,因而正在分离的十字形的同源染色体配对特别清晰。图 1b 为 MII 分裂相,表现为姊妹染色单体尚未分离前的 20 个姊妹染色体的形态。图 1c 为第一次减数分裂早中期分裂相的 C 带图,可见尚存在交叉的终变期染色体和正在分离的同源染色体。每对同源染色体均有二个着丝粒,着丝粒的个数为 40。

制备卵母细胞染色体时,有采用在小离心管低渗、固定⁽³⁾,或在表面皿里低渗、固定方法⁽⁵⁾,其目的都是防止卵母细胞的丢失,我们在试验发现,由于卵母细胞本身的粘附作用和不同溶剂相的扰动,这些方法还是容易造成细胞的丢失,所以我们采用低渗后放在载玻片上固定的方法。但是包含卵母细胞的液体,每滴尽量不超过 2 毫米直径。同时,固定时卵母细胞易随液体流动,极易造成染色体的丢失。因此,必须等液滴的液体快干、卵母细胞刚刚铺展在载玻片上时,用吸卵管滴加固定液。固定过程中不能让其干燥,固定时间宜长些,以去除卵母细胞浓厚的细胞质。同时,将低渗后的卵母细胞直接放在载玻片上固定不易造成卵母细胞的丢失,并可在固定细胞的地方作记号,便于观察。

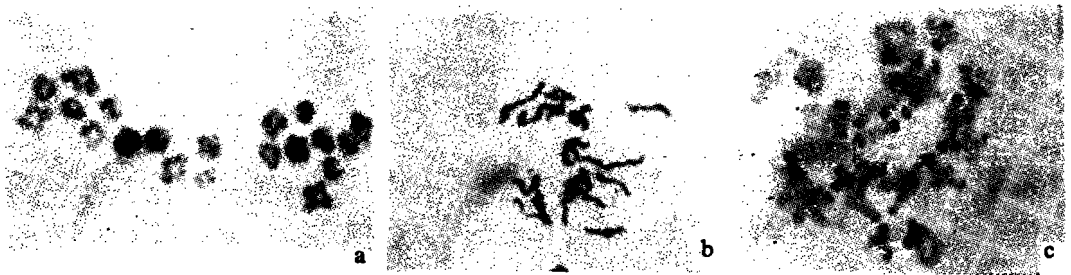


图 1 小鼠卵母细胞减数分裂中期 I 晚期的分裂相(a)、中期 II 的分裂相(b)及早中期分裂相的 C 带(c)(×200)

减数分裂染色体制备对研究减数分裂过程中雌性生殖细胞同源染色体联会,遗传物质交换以及染色体减数(由二倍体减至单倍体)等现象的规律,以及环境中各种诱变因子对其影响提供了方便,特别是一些遗传病是由于减数分裂过程中染色体分离不完全所致,如一些非整倍体的发生等⁽⁶⁾。所以,建立制备卵母细胞染色体方法,根据卵母细胞减数分裂过程中染色体的变化研究一些染色体病的发病机理具有一定的意义。

参 考 文 献

- (1) 王子淑编著, 1987. 人体及动物细胞遗传学实验技术, 成都: 四川大学出版社.
- (2) 黄天华等, 1987. 遗传与疾病, 4(3): 174.
- (3) 苏瑞珍, 何 建, 1982. 科学通报, 27(24): 1523—1524.
- (4) Browder L W *et al*, 1991. Developmental Biology(Third edition), Saunders College Publishing, pp. 54—124.
- (5) Eichenlaub-Rutter U, Boll I, 1989. Cytogenetic Cell Genet., 52: 170—176.
- (6) Eichenlaub-Rutter U, 1993. Chromosomes Today. Sumner AT and Chandly AC Eds. Chapman and Hall Press, London. V. II, pp. 323—336.

本文于 1995 年 11 月 6 日收到, 1996 年 5 月 2 日修回。