

减数分裂联合会复合体整体制片的银染技术

牛新华¹, 邢娟²

(滨州医学院 1. 生物教研室; 2. 物理教研室, 山东 滨州 256603)

摘要:用硝酸银染色技术制备联合会复合体标本片,取动物睾丸精母细胞用微铺展技术制成细胞片,利用本室改进的硝酸银染色技术进行染色,镜下观察联合会复合体着色清晰,效果稳定,不易褪色,用于生物实验教学和科研取得良好效果。

关键词:硝酸银染色技术;减数分裂;联合会复合体

中图分类号:Q81 文献标识码:B 文章编号:1006-7167(2002)03-0079-03

Preparation of Meiosis Integrate Synaptonemal Complex Specimen with Improved Silver-Staining Technique

NIU Xin-hua¹, XING Juan²

(1. Dept of Biology; 2. Dept. of Physics, Binzhou Medical College, Binzhou 256603, China)

Abstract: The synaptonemal complex specimen was prepared by performing surface microspreading and silver-staining (improved by our lab) technique on spermatocytes from testicles of male animals. Electron microscopy showed the synaptonemal complexes dyed clear, stable and durable. Applied in biological research and teaching experiments, this improved silver-staining technique could produce good results.

Key words: silver-staining; meiosis; synaptonemal complex

1 前言

在生物学实验教学中,减数分裂是重要的实验内容之一,但学生对发生在减数分裂前期同源染色体的配对重组、分离等染色体的复杂变化,由于制样方法的限制,往往难以理解,而同源染色体配对时形成的联合会复合体(Synaptonemal Complex, SC)是减数分裂的关键,与同源染色体的交叉、互换、重组和分离有着密切的关系,在生物减数分裂制片中,用改良苯酚品红、醋酸洋红等染液染出的标本,只能显示同源染色体而看不到SC的结构及交叉、重组过程,大专院校的教材或专业参考书中,SC的结构多停留在文字描述和连续超薄切片三维重组的电镜照片上,未见SC形成过程的照片,没有给读者以同源染色体配对,交叉、互换重组的直观感觉。1973年Counce和Meyer发明了SC的界面铺展技术,成功地把SC铺展在载玻片上,运用磷钨酸(Phosphotungstic acid, PTA)染色方法,在电镜下看到了SC的三层结构^[1],但由于PTA染色的SC在

普通光镜下反差小,甚至没有反差,只能在相差显微镜下才能分辨。后来,随着硝酸银染色技术运用,发现硝酸银染色技术不仅能选择性的染色核仁组成区^[2-3],还能使减数分裂前期的SC特异性着色,硝酸银染色的SC在普通光镜下便能观察到,并与电镜技术结合大大加快了SC的研究。由于硝酸银染色时对温度、时间、染液及器皿等方面要求较高,所以染出的标本往往不够理想,若掌握不好,甚至染不上颜色,笔者在近几年硝酸银SC染色技术实验中,不断探索、改进,成功地获得了SC标本的理想制片。本文介绍这一技术的试验方法和注意问题。

2 硝酸银SC染色法的改进

2.1 染色装置

在60℃恒温水浴箱的水面上放一底部垫有湿滤纸的大培养皿预热,在滤纸上平行放置两根牙签,同时在水浴箱内预热盛有蒸馏水的烧杯,以备冲片用。

2.2 材料与试剂

将动物睾丸精母细胞用生理盐水制成悬液,根据微铺展技术制成细胞片^[4]。晾干后用4%多聚甲醛固

定备用。配制 50% 硝酸银和 2% 明胶(内含 1% 的甲酸), 以上两种试剂滤纸过滤后分别装在两个滴管直径完全相同的棕色试剂中保存(可存放 1 周左右)。

2.3 染色方法

染色时硝酸银与明胶按 2:1 比例临时配成混合液, 迅速将 3~5 滴混合液滴加在制好备用的标本片细胞处, 立即将标本片放在恒温水浴箱内预热大培养皿中的平行牙签上, 盖上水浴箱盖、避光染色 5~10min, 当染液呈棕褐色时, 用预热的蒸馏水彻底冲片、晾干、镜检。

2.4 注意问题 要制备出理想的银染 SC 标本片, 要注意以下几点:

(1) 染色过程中所用的恒温水浴箱, 玻璃器皿、滤纸等一定要保持洁净。水浴箱内要用蒸馏水, 玻璃器皿要严格刷洗, 洗液浸泡后经自来水、蒸馏水彻底冲洗。在银染过程中, 水浴箱的蒸馏水滤纸、牙签要经常更换。配制的硝酸银染液越新鲜染色效果越好。

(2) 恒温水浴箱一定要温度恒定, 否则无法掌握染色时间, 在染色技术操作时, 要注意及时盖严水浴箱盖。

(3) 硝酸银染色的时间是最关键的一步。染色时间短, SC 根本不着色或着色浅, 与背景反差小。染色时间长, 背景呈深黄色, SC 也难以辨认。据笔者的银染经验, 染色在 6~7min 之内效果最佳。

3 结果与讨论

改进后银染方法优点是: (1) 快速, 染液中加入甲酸后, 染色时间由原来需染色 30min 以上缩短为 5~6min。(2) 染色装置简单便于观察, 可根据染色过程中染液的颜色变化掌握染色效果。(3) 以往染色时在玻片覆上试镜纸, 染液滴满整张玻片, 染液用量大, 且银染后 SC 制片上易留下试镜纸纤维, 影响观察, 现在只需要在玻片的细胞处滴加 2~3 滴染液, 节省试剂。银染后的 SC 制片, 肉眼观察呈金黄色, 光镜片背景呈浅黄色, SC 被染成深褐色, 且着色清晰, 效果稳定。标本保存时间长。在高倍镜下可观察到 SC 的形态、数目, 并可区别常染色体与性染色体的 SC, 若要制成电镜样品, 只需将样品转移到电镜铜网上直接观察, 拍照, 既避免了过去连续超薄切片三维重组的繁琐过程, 又可直接制备整条 SC, 甚至全套 SC 核型, 这是超薄切片无法做到的。电镜下 SC 的两个侧生组分, 中央组分非常明显(有些动物如小鼠等中央组分不着色), SC 配对时呈不同方式进行, 有的从端粒开始配对(见图 1), 有的 SC 从内部某些部位开始联会(见图 2), SC 交换, 重组清晰可见(见图 3), 但并非所有的 SC 都有交换, 有的甚至一个交叉也没有, (见图 4), 这些观察结果, 直观的展现了减数分裂时同源染色体遗传物质之间的交

换和重组。

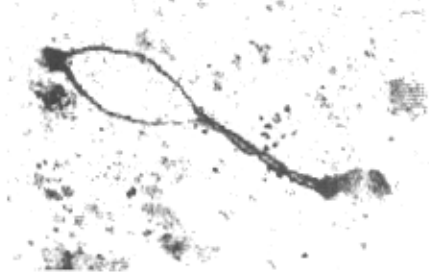


图 1 偶线期同源染色体 SC 从端粒开始的拉链式联会 $\times 13000$

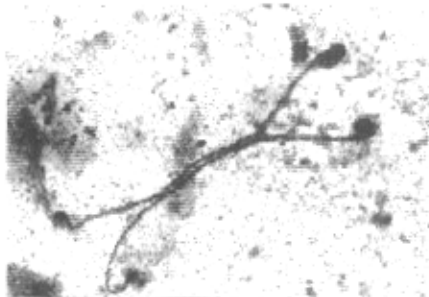


图 2 偶线期同源染色体 SC 从内部多点同时配对 $\times 13000$

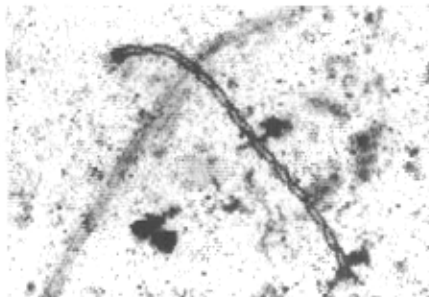


图 3 粗线期常染色体 SC, 有多个交叉出现 $\times 9100$

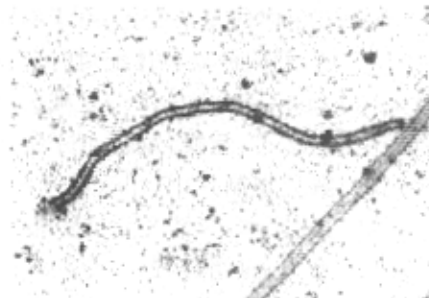


图 4 粗线期常染色体 SC, 两条侧生组分平行, 无交叉出现 $\times 11700$

我们把 SC 进行光镜示教, 电镜照片运用到减数分裂实验教学中收到很好的效果, 此技术尚可运用于多种动、植物的 SC 核型分析和研究, 并可广泛应用于细胞遗传学、遗传毒理学、生殖生物学等诸多学科的研究。

参考文献:

[1] Counce S and Meyer G. Differentiation of the synaptonemal complex and the kinetochore in locusta spermatocytes studied by whole mount electron microscopy[J]. Chromosoma,1973(44): 231-253.

[2] Bloom S and Goodpasture C. An improved technique for selective silver seaining of nucleolar organizer regions in human chromo-

somes[J]. Hum. Genet., 1976(34):199-206.

[3] Howell W M, Black D A. Controlled silverstaining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method Experimentia[J]. 1980(36):1014-1015.

[4] Moses M. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster[J]. Chromosoma,1977(60):99-125.

第一作者简介:牛新华(1958—),女,实验师。

(上接第 71 页)

其中此 DHCP 服务器地址是 202. 38. 120. 99
地址池地址是参加此作用域动态地址分配的范围
地址租约是已经分配出去的地址和相应的租约情

况

保留是指可以根据客户机的名称和 MAC 地址事先预留 IP 地址给特殊用户。

作用域选项指的是 gateway、dns、wins 等选项。

(4) 可按照地址实际情况再添加多个作用域。

(5) 在服务中启动 Dhcp Client

3.2 LINUX 系统

由于其 Free、多任务、稳定性、强大的网络功能并能有一群热心人在发展维护它,所以现在越来越受到广大用户的青睐。

在 Linux 上配置 DHCP Server 比较简单,以 Red Hat Linux release6.2 为例:

(1) 安装。首先从 ftp://isrv4.pa.vix.com/isc/dhcp 下载

dhcp-3.02p123.tar.gz 或
dhcp-latest.tar.gz,然后解压
tar zxvf dhcp-latest.tar.gz
生成 dhcp-3.0b2p122 目录
进入后,编译安装

./configure
make
make install

在/usr/sbin中会有dhcpd

(2) 配置。首先建立 route add -host 255. 255. 255. 255 dev eth0(可加在/etc/rc.d/rc.local中)建立/etc/dhcp.conf,例文如下:

```
{
ddns-updata-style ad-hoc;
default-lease-time 1200;/* 如果客户不继续请求
DHCP 地址则 1200 秒后释放 IP 地址 */
max-lease-time 7200;/* 最大允许租用的时间为 7200 秒 */
option subnet-mask 255. 255. 255. 0;/* 子网掩码 */
option broadcast-address 202. 38. 120. 255/* 广播地
址 */
option routers 202. 38. 120. 97;/* 默认网关 */
```

```
option domain-name-servers 202. 112. 0. 35,202. 120.
2. 101;/* DNS 服务器 */
option domain-name "sjtu.edu.cn";
subnet 202. 38. 120. 0 netmask 255. 255. 255. 0{
range 202. 38. 120. 10 202. 38. 120. 88;
range 202. 38. 120. 150 202. 38. 120. 200;
}/* DHCP 服务器分配两段地址范围给客户 202. 38.
120. 10-88 或者 202. 38. 120. 150-200 */
host sherry{
hardware ethernet 08 : 00 : 2b : 4c : 59 : 23;
fixed-address 202. 38. 120. 99;
}/* 某块网片指定固定的 IP 地址,无论何时,这
块网片总是从 DHCP 服务器获得固定的 IP 地址 */
}
```

(3) 再运行/var/state/dhcp/dhcpd.leases,用于存放租期情况。

(4) 运行/usr/sbin/dhcpd即可。

4 Client 端的配置和使用

(1) MS 的客户端设置:

WIN98 和 NT 中只要在控制面板-»网络-»TCP/IP-»IP 地址中设成自动指定 IP 地址即可。2000 中除了上述步骤外,另外要在控制面板-»管理工具-»服务中将 DHCP Client 设置成为自动或手动。
使用 ipconfig /renew 获得 IP 地址,使用 ipconfig /release 释放地址。

(2) LINUX 中的设置:

以 RedHat 6.2 为例,在 shell 中执行 netconf→Basic host information 中设置为自动获得 IP 地址即可。

参考文献:

[1] IETF. Dynamic Host Configuration Protocol (EB) RFC2131, 1997.

[2] IETF. DHCP Options and BOOTP Vendor Extensions (EB) REC2132,1997.

[3] IETF. Dynamic Host Configuration Protoco(EB) RFC1531,1993.

[4] 戴有炜,陆年德. NT Server4.0 专业指南[M]. 北京:清华大学出版社,1997.

第一作者简介:谢锐(1974—),男,学士。

作者: [牛新华, 邢娟](#)
作者单位: [牛新华\(滨州医学院, 生物教研室, 山东, 滨州, 256603\), 邢娟\(滨州医学院, 物理教研室, 山东, 滨州, 256603\)](#)
刊名: [实验室研究与探索](#) 
英文刊名: [LABORATORY RESEARCH AND EXPLORATION](#)
年, 卷(期): 2002, 21(3)
被引用次数: 3次

参考文献(4条)

1. [Counce S](#) Differentiation of the synaptonemal complex and the kinetochore in locusta spermatocytes studied by whole mount electron microscopy[外文期刊] 1973(44)
2. [Bloom S;Goodpasture C](#) An improved technique for selective silver seaining of nucleolar organizer regions in human chromosomes[外文期刊] 1976(34)
3. [Howell W M;Black D A](#) Controlled silverstaining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer:a 1-step method[外文期刊] 1980(36)
4. [Moses M](#) Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster[外文期刊] 1977(60)

引证文献(3条)

1. [张礼生](#) 棉铃虫与烟青虫细胞遗传学比较研究[学位论文]博士 2004
2. [付建业](#) 甜菜夜蛾细胞分裂染色体行为及染色体核型的研究[学位论文]博士 2004
3. [张礼生](#), [张青文](#), [蔡青年](#), [徐静](#), [周明群](#) 中国昆虫染色体研究现状与展望[期刊论文]-[昆虫学报](#) 2003(6)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_sysyjt200203031.aspx