

正常家猪联会复合体的组型分析

单继东 邹明谦 张传善

(东北师范大学生物系 长春 130024)

有关家猪 (*Sus scrofa domestic*) 染色体的研究国内外已有许多报道, 其中包括染色体的 G 分带、C 分带、R 带及组型分析等。早在 1972 年 Berger 和 Hansen 就分别开始了猪的 G 分带研究^[1,2], C 带的研究也是 1974 年由 Hansen 首次报道^[3]。在国内, 陈文元, 王子淑 1979 年^[4]报道了家猪体细胞染色体组型, 随后于汝梁^[5]、柳万生^[6]分别报道了家猪染色体高分辨 G 带的研究。但是关于家猪的联会复合体 (Synaptonemal Complex, SC) 的组型分析, 国内尚未见报道。本文采用了表面铺展常规制 SC 的方法、硝酸银 (Ag-染色) 和磷钨酸 (PTA) 两种染色技术, 对家猪的 SC 进行了组型分析。同时比较了两种染色方法的优缺点, 并且对实验中摸索的一种低温保存哺乳动物睾丸制备 SC 的可行方法进行了讨论。

材料和方法

一、材料

由中国人民解放军农牧大学提供长白后备种猪, 雄性; 睾丸是通过外科手术活检取得的。

二、方法

1. Ag-染色方法: 去除睾丸白膜, 切下所需材料, 按常规方法低渗处理 20 分钟, 滴片, 固定, 然后用 50% AgNO₃ (加 2% 明胶) 染色 (60℃ 10—15 分钟)。在光学显微镜下找到分散良好, 反差清晰的相, 镀 Formvar 膜, 揭膜, 转移至 50 目铜网上, 电子显微镜下观察, 拍照 (H-600-Z 型, 电压 100 kV)。

2. PTA-染色方法: 将材料置 0.375% KCl 低渗处理 20—30 分钟, 滴片晾干, 用 4% 多聚甲醛 (0.1 mol/L 蔗糖溶液配制) 固定 10—15 分钟, 迅速用 1% PTA

(先用水配制 4% 的 PTA 溶液, 此液可以置冰箱内保存几天, 用时取出, 以 95% 的乙醇稀释 4% 的 PTA 至 1% 的 PTA) 染色 5—10 分钟, 然后立即置 95% 乙醇中振荡洗涤 20—30 秒, 晾干。在相差显微镜下找到分散良好、反差清晰的相、上膜、揭膜, 转移至 100 目铜网上在电子显微镜下观察, 拍照。(H—600 Z 型, 电压 76 kV)

3. 冰冻贮存法: 睾丸用 0.9% NaCl 洗去杂物, 不除去白膜, 用塑料制品将其包好, 放入 -18℃ 冰箱或冰柜中速冻。待要取材时, 在室温下切下所需材料, 将其余的再包好放入冰柜内, 以备后用。切下的材料于室温下缓慢解冻, 按常规制备 sc, Ag 染色, 光学显微镜, 电子显微镜镜检, 拍照。

结 果

一、家猪的 SC 组型分析

家猪精母细胞减数分裂粗线期 Ag 染相 (如图版图 1 所示), 其全套 SC 由 19 个二价体组成 (其中有一个 XY 二价体), 即染色体组型为 $2n = 38, XY$ 。可是在图版图 1 中我们只能看到组成每条 SC 的二侧轴, 看不到中央组分和着丝点, 这可能是哺乳动物染色体的着丝点不嗜银的缘故^[1]。而图版图 2(a)—PTA 染色体的 SC 相中, 不仅可见每条 SC 的两侧轴, 而且能看到中央组分和着丝点。我们根据 10 个精母细胞中每条 SC 的相对平均长度值 (表 1), 绘制了组型图 (见图)。根据表 1 中的着丝点指数——着丝点的位置可把家猪的染色体分为四组:

A 组: 1 号—4 号: 亚中央着丝点染色体。

B 组: 5 号—6 号: 近端着丝点染色体。

C组: 7号—12号: 中央着丝点染色体。

D组: 13号—18号: 端着丝点染色体。

X是最小的中央着丝点染色体, 大小与8号染色体相似, Y是最小的端着丝点染色体, 很易被辨认。

二、冰冻材料的sc相

图版图3所示为冰冻78天的精母细胞染色体SC的粗线期铺展全相, 与图版图1新鲜材料作的SCAg染相相比较可见, 冰冻材料的SC形态正常, 二者无细胞形态学的差异, 图版图3中, 整套SC、XY二价体清晰可见, 没有SC断裂或是解体现象。由此可见, 保存80天左右的动物材料仍可做为SC组型分析用。

表1 10个精母细胞粗线期SC的测量结果

No. of SC	R. M. L.	S. D.	Ci
1.	8.886	0.35	33.07
2.	7.549	0.071	27.94
3.	6.374	0.069	34.80
4.	5.198	0.63	32.95
5.	6.881	0.070	18.26
6.	6.213	0.21	21.34
7.	5.106	0.78	49.66
8.	4.749	0.84	42.23
9.	4.391	0.23	39.31
10.	4.334	0.28	41.43
11.	4.034	0.42	46.86
12.	3.527	0.38	43.2
13.	7.227	0.91	
14.	5.371	0.98	
15.	4.288	0.57	
16.	4.011	0.56	
17.	2.870	0.35	
18.	2.550	0.84	
X.	4.553	0.49	49.73
Y.	1.879	0.48	44.79

S. D.: Standard Deviation 标准偏差

$$s = \sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 / n - 1}$$

R. M. L.: Relative Mean Length 相对平均长度

C. i.: Centromere Index 着丝点指数

$$Ci = P \times 100 / (P + Q)$$

P: short arm length 短臂长度

Q: long arm length 长臂长度

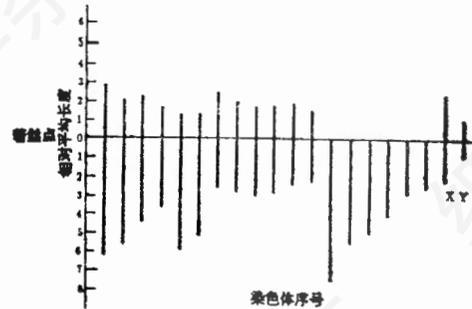


图 家猪染色体组型图

讨 论

一、两种染色法的比较

在实验过程中, 我们采用了两种染色方法来研究SC, 一个是Ag-染色, 一个是PTA染色。由实验结果可见, 哺乳类中Ag染SC, 着丝点区在电子显微镜下看不到, 而PTA染色, 着丝点、端粒等染得明显。Ag染可以把SC染色很清晰, 但细致结构染不好或染不出来; PTA染色可看到SC的三条轴线(两条侧生组分, 一条中央组分)(图版图2(b)), 这对于以后研究重组节更是不可缺少的了。当然, PTA染色法清晰度不如Ag染, 而且在光学显微镜下看不到, 只能在相差显微镜下看, 所以也很繁琐。因此应根据需要来选择染色方法。

近年来也有报道^[8], 采用低温长时间缓慢银染可以染出SC的精细结构, 这样看来就有希望抛开繁琐的PTA染色技术, 但这种方法是否可以普遍推广还需进一步验证。

二、冰冻材料的贮存

随着SC技术的日益成熟, 许多论文都在探讨减数分裂染色体的联会形式以及杂合染色体对二价体形成的影响等^[9]。其中多数工作所用的实验材料都局限于人、家畜或实验室易得到的动物。这样, 进行SC分析就只能限制在很小的生物范围内。其主要原因是SC的制备多限于新鲜材料, 不能先固定后铺片, 所以许多不易得到的材料, 或是得到了材料又保证不了马上制备, 都会妨碍其SC的研究的。如果采用了我们的方法, 这些问题就会得到一定程度的解

决。这样进行SC分析的生物范围不仅可以得到扩大,而且SC分析还可以应用到对哺乳类自然群体的染色体多态的检查中。本文的方法可以使进行SC组型分析的有效细胞学时间由原来的1—3天延长至70—80天。这种方法仅仅从搞SC研究来看是可行的,但是否适合其他方面的研究还需进一步探讨。

摘 要

本文采用AgNO₃和PTA两种染色技术,常规制SC的铺展法对家猪精母细胞的SC进行了详细的电子显微镜下的观察和分析,绘制了组型图。实验中发现PTA染色法较适合家猪的SC分析。同时摸索了一个简便可行的低温保存哺乳类睾丸的方法。

图 版 说 明

1. 家猪精母细胞粗线期SC Ag染相,示染色体组型为 $2n=38, XY$ 。×1500
2. (a)家猪精母细胞粗线期SC的PTA染相,箭头示着丝点。×2140

(b)一条SC的放大相。K示着丝点,小箭头指示中央组分。×6920

3. 冰冻78天的家猪精母细胞粗线期SC Ag染相。×2000

参 考 文 献

- [1] Berger R., 1972, *Exp. Cell Res.*, 75: 298—300.
- [2] Hansen K. M., 1972, *Cytogenetics*, 11: 286—294.
- [3] Hansen K. M. Melander E. et al., 1974, *Hereditas*, 77: 149—158.
- [4] 陈文元、王子淑, 1979, *遗传* 1(5): 6—10.
- [5] 于汝梁、辛彩云, 1989, *畜牧兽医学报* 20(4): 295—299.
- [6] 柳万生、路兴中, 1990, *畜牧兽医学报* 21(1): 36—40.
- [7] Sudman P. D., 1989, *Genome*, 32: 380—382.
- [8] Sherman J. D., Herickhoff L. A. and Stack S. M., 1992, *Genome*, 35: 907—915.
- [9] Sudman P. D., 1989, *Cytogenet. Cell Genet.*, 52: 88—89.

《实验生物学报》、《细胞生物学杂志》

收取送审费和发表费的实施办法

根据三届四次理事会决议,两刊自1990年起收取送审费和发表费。

1. 1990年后投寄两刊的稿件,每篇收取送审费40元,以支付该稿的审稿费、邮寄费等。无论文章发表与否,该款不再退还。

2. 《实验生物学报》自1990年第1期起收取发表费。根据中科院出版图书情报委员会(92)出字33号文件精神,1994年第2期起调整为每版面80元(包括随文图表、参考文献等)。

3. 《细胞生物学杂志》自1993年第1期起收取发表费。1994年第2期起调整为每版面70元(包括随文图表、参考文献等);插页铜版纸图版每版90元(包括图版说明)。投杂志的简讯等酌情收费。

4. 发表费通知单在寄作者校样时一并附上。

5. 送审费请在投稿的同时分别寄交《实验生物学报》、《细胞生物学杂志》编辑部(上海市岳阳路320号,邮政编码200031)。若汇入我所帐户,务请注明“学报”或“杂志”审稿费。

6. 发表费请汇至中国科学院上海细胞生物学研究所,帐号221-08900645工商银行徐办淮分处。汇款时注明“学报”或“杂志”发表费。

《实验生物学报》

《细胞生物学杂志》编辑部

1994.4