

K. I. Berns ed. Plenum Press, New York & London, pp. 297—362.

[13] Chen, Y. Q., et al. 1986. *Cancer Res.* 46: 3574.

[14] Tattersall, P., 1978. in "Replication of Mammalian Parvoviruses", D. C. Ward & P. Tattersall eds., CSH Lab., CSH pp. 3—12.

## 用整体解离法制备两栖类蝌蚪细胞染色体

王 纆 琦

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

两栖类是实验胚胎学研究中最常用的实验动物之一。随着研究的不断深入,两栖动物发育过程中基因表达调控、核质关系和细胞分化等发育生物学问题已受到广泛的重视。为了深入探讨两栖类的发育过程,有必要研究两栖动物发育中染色体的变化<sup>[1,2]</sup>。目前,两栖动物原肠期胚胎细胞和成体细胞的染色体制备方法已经建立<sup>[3,4]</sup>,但蝌蚪细胞染色体的制备却缺乏简便而又可靠的方法。为此,将作者近年工作中总结出来的整体解离法介绍如下:

### 材料与 方法

实验动物取自本实验室饲养的非洲爪蟾(*Xenopus laevis*),经人工催产后,把受精卵置于 Holtfreter 溶液中培养,随时观察其发育情况。

1. 当胚胎发育至 37 期—47 期时(按 Nieuwkoop 的发育分期<sup>[5]</sup>),吸取 3—5 只蝌蚪,置于无  $Ca^{++}$ 、 $Mg^{++}$  的 Steinberg 分离液中,针刺头部处死。

2. 加入秋水仙素溶液,使最终浓度为 20 微克/毫升,室温下培养 14 小时。

3. 将蝌蚪吸入 Down 氏玻璃组织匀浆器(松型)中,加入 4 毫升培养液,缓慢地上下抽动匀浆器 2—3 次,制成细胞悬液。

4. 把细胞悬液收集于离心管内,弃去不能悬浮的组织块,然后迅速离心(1000 r/min, 8 分钟)。弃去上清液,加入 4 毫升 0.4% 氯化钾,用滴管把细胞团打散,室温下低渗处理 7 分钟。

5. 加入等量新鲜固定液(甲醇:冰醋酸 = 3:1)进行预固定,2 分钟后离心(1000 r/min, 8 分钟),弃去上清液,再加入 8 毫升新配固定液,再悬浮,20 分钟

后,离心(1000 r/min, 8 分钟),换入新鲜固定液,再悬浮后,盖上管口,置 4℃ 冰箱过夜。

6. 次晨,取出固定细胞,离心后弃上清液,加入 1 毫升新鲜固定液,制成细胞悬液,按常规空气干燥法制片,1/10 Giemsa 染液(pH 6.8)染色 30 分钟。

### 结果和 讨论

用上述方法制得非洲爪蟾蝌蚪细胞的中期分裂相染色体,并排出了染色体组型(见图 1)。从图中可见,染色体结构清晰,分散良好。非洲爪蟾染色体数为  $2n = 36$ 。根据着丝点位置,可将全部染色体分为 3 组,其第 1—7 对染色体为中部着丝点染色体(m);第 8—14 对为亚中部着丝点染色体(sm),第 15—18 对为亚端着丝点染色体(st)。

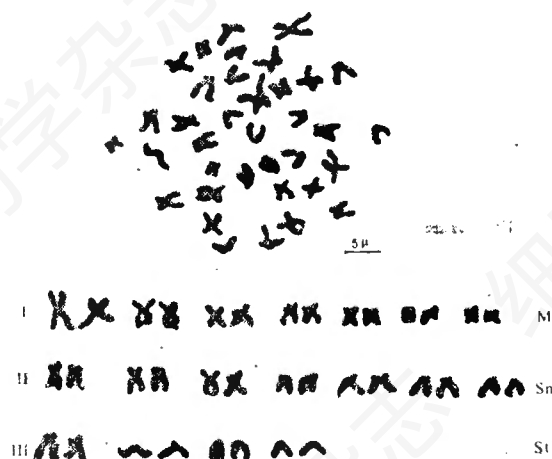


图 1 非洲爪蟾蝌蚪细胞的染色体及其染色体组型

两栖类蝌蚪个体小,难以用通常在成体中使用的的方法来制备染色体。Di Berardino曾采用蝌蚪尾尖压片法制备染色体<sup>[1]</sup>,但用这种方法获得的染色体中期分裂相比较少,染色体分散程度常不理想,易受人为因素影响。考虑到蝌蚪期坚硬的骨骼系统尚未形成,许多组织的细胞都处于旺盛的分裂时期,这就为用整体蝌蚪制备染色体提供了条件。我们的体会是,整体解离法简便可靠,一般能得到大量的分散适度的中期分裂相,适用于无尾和有尾两栖类蝌蚪染色体组型的研究。为了制得较理想的染色体分裂相,有以下几点需引起注意:

1. 为了减少匀浆时细胞破裂,利于制备单细胞悬液,应在秋水仙素处理的同时,处死蝌蚪,置无  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  的两栖类分离液中培养,促使组织细胞间粘着松散。抽动匀浆器时应轻缓,不要用力挤压。

2. 如所取材料为发育较早时期的蝌蚪(36期—40期),最好将其腹部含大量卵黄的细胞除去,以免影响细胞匀浆和悬浮。

3. 蝌蚪期肌肉已分化形成,呈纵长纤维状,匀浆后,肌纤维通常不易悬浮,而其他细胞经低渗处理后,细胞体积胀大,如有相互缠绕的粗糙肌纤维存在,在随后的离心、固定过程中,细胞与这些粗大纤维摩擦,极易破裂,导致中期分裂相大大减少。因此,在低渗前,需将不悬浮的肌纤维除去。

4. 由于本实验是用整体材料培养,制备染色体时,秋水仙素处理时间需较长。另外,低渗处理直接关系到染色体制片的成败,一定要掌握适当的低渗时间,既要使细胞得到充分膨胀,又要使细胞不至于破碎。

### 摘 要

长期以来,两栖类蝌蚪细胞染色体标本的制备一直沿用压片法,该法可靠性较差。作者根据蝌蚪期细胞分裂旺盛的特点,用整体蝌蚪为材料,在秋水仙素处理的同时,利用两栖类分离液解离并辅以匀浆器离散组织,使得一次操作能获得大量分散适度的中期分裂相染色体。整体解离法简便可靠,能制得质量较好的染色体玻片标本。

### 参 考 文 献

- [1] Di Berardino, M. A., 1962, *Develop. Biol.* 5(1): 101—126.
- [2] Yamamoto, K. Y., K. Yamazaki, and Y. Kato., 1980. *Develop., growth and differ.* 22 (2): 79—92.
- [3] Sharma, A. K. and A. Sharma., 1980. *Chromosome Techniques. Third Edition Butterworth and CO. London Boston.*
- [4] 吴政安, 1982, *遗传*, 4(1): 38—39.
- [5] Nieuwkoop, P. D. and Faber, J., 1967. *In Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin). Amsterdam: North Holland Publishing Co.*

## 测定粒单系集落刺激因子的<sup>3</sup>H-TdR掺入的微量培养方法

张明伟 黎 燕 唐佩弦

(军事医学科学院基础医学研究所)

随着许多造血细胞增殖、分化、生长因子的纯化及分子重组克隆技术的发展,人们希望能在较短的时间内,用较简单的方法对造血细胞生长因子的活性进行定性和定量分析。以往许多实验室多采用琼脂或甲基纤维素的半固体

培养方法<sup>[1,2]</sup>,对造血生长因子的生物活性进行定性和定量测定。本文采用<sup>3</sup>H-TdR掺入的微量培养方法<sup>[3]</sup>,通过培养中粒单系祖细胞增殖时DNA合成量的变化来观察CFU-GM的增殖状态。并与琼脂半固体培养结果相对应,