

# 冷处理金黄仓鼠卵和四种不同培养液对人精子染色体制备的影响

李运星 马天根 马长俊 杨式之\*

(四川省计划生育科学研究所组胚遗传室)

1978年以来国外研究者利用经人精子受精后的去透明带金黄仓鼠卵,并经短期培养后获得人精子单倍染色体这一技术,对正常男性精子染色体的自然畸变率,平衡易位携带者的精子染色体重组,以及化学、物理、年龄等因素对精子染色体的致畸变影响进行了研究<sup>[1-3]</sup>。国内除极个别的简单方法学介绍外<sup>[4]</sup>,尚未见研究内容的详细报道,其原因之一是取得这种卵细胞的时间要求短,操作要快,否则卵会老化,影响最后实验结果。但时间的限制增加了实验操作的难度,不利于广泛开展这项研究,为此我们根据冷环境可使细胞代谢变慢、氧耗下降这一原理<sup>[5]</sup>,将金黄仓鼠离体输卵管和含卵细胞的颗粒细胞团块置4℃左右环境中,从而在分离制备卵细胞时,可使其老化变慢,利于操作者有充足时间工作,这对广泛开展人精子染色体研究是有益的。在国内、外有关文献中,作者们提出各自认为对实验结果最有利的培养液<sup>[1,4,6,7]</sup>,但均无详细数据,从而导致意见不统一。为此,本文作者用4℃环境保存的卵细胞与未经4℃环境保存的卵细胞以及4种培养液对人精子染色体制备的影响进行了对照比较,现报道如下。

## 材 料 和 方 法

### 1. 实验前的准备

鼠卵的超排,高活力人精子提取与获能,BWW工作液,3%高蛋白液配制均同杨育州<sup>[4]</sup>和Brandriff<sup>[8]</sup>等的报道一致。

冷处理组卵的制备:游离出输卵管后,将其置

4℃左右的BWW工作液里,在无菌室内每取出一条颗粒细胞团块,立即将其吸入另一份4℃左右的工作液中。当全部细胞团块取完后,将其移入37℃透明质酸酶液中,酶液浓度为300 i. u/ml。在4℃环境中保存时间约15—20分钟。未经冷处理组卵的制备同Brandriff<sup>[8]</sup>。两组制备卵的时间均控制在50—60分钟。两组的人精子获能、受精时间、供精者参加两组实验的次数基本控制一致。在培养液对比实验中,卵细胞制备都经冷处理。

### 2. 培养液和卵的分配

选用4种常用的培养液:F<sub>10</sub>、199、卵培养液、改良BWW液。将制备好的卵细胞放入一个或两个授精小皿中授精,授精后洗涤两次,在解剖镜下将其分为数目大致相等的4组,随机进入4种培养液中。

受精时和异种受精卵培养无需石蜡油覆盖液面。

### 3. 标本的制备

参考Dyban<sup>[9]</sup>、Kamiguchi<sup>[6]</sup>、和我室羊水细胞染色体的制备方法<sup>[10]</sup>,自行设计了一套操作方便、扩散效果好,制片时间短、节省试剂的制片方法。(一)低渗:用0.075 mol KCl和0.9%枸橼酸钠以3:2组成低渗液,低渗时间10—15分钟。(二)固定:固定液为A、B两种;A液为甲醇、冰醋酸、水以4:1:0.75配成,用前2小时配制,-30℃冷藏。B液为甲醇3份、冰醋酸1份、新鲜配制。低渗后的卵在A液中固定5分钟左右,吸出卵细胞和少量A液滴于玻片的圆圈区域内,让其自然扩散后,滴B液1滴或数滴,气干后用4%Giemsa染色或作显带用,见图1和图2。

### 4. 计数指标及计算方法

计算指标为:(1)每张玻片上所观察到的细胞总

\* 华西医科大学妇产科。

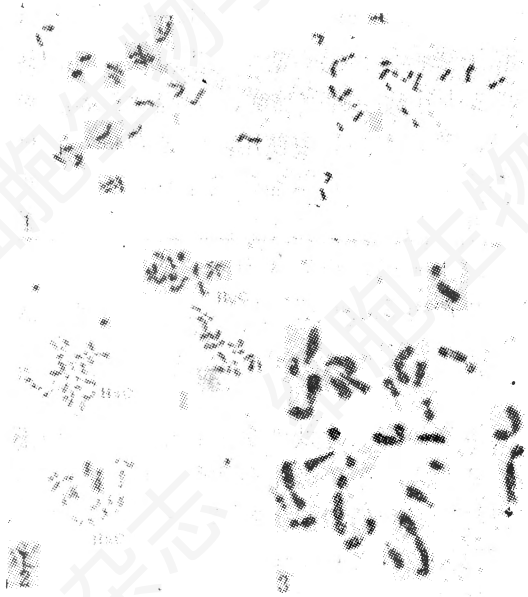


图 说 明

- 1 一个金黄地鼠卵细胞内分散良好的一组人精子单倍染色体(HuC)和一组卵细胞单倍染色体(HaC) 400× 卵经冷处理
- 2 一个金黄地鼠卵细胞内分散良好的一组人精子单倍染色体(HuC)和两组卵细胞单倍染色体(HaC) 200×
- 3 分散良好的人精子单倍染色体 黑箭所指为细丝状特殊结构 1000×

数, (2) 有染色体的卵细胞数, (3) 人的单倍染色体组分散情况, 分级见表 4 所注, (4) 每个卵细胞内精子膨大头与原核数。计算公式为:

$$(1) \text{ 穿透率} = \frac{\text{观察到的受精卵细胞数}}{\text{观察到的卵细胞总数}} \times 100\%$$

$$(2) \text{ 染色体出现率} =$$

$$\frac{\text{观察到的有染色体的卵细胞数}}{\text{观察到的卵细胞总数}} \times 100\%$$

## 结 果 与 讨 论

### 1. 冷处理组与未经冷处理组

冷处理组共进行了 12 次实验, 观察卵细胞 1058 个, 平均精子穿透率为 81%(62—89%), 平均染色体出现率为 76%(55—89%); 未经冷处理组共进行了 13 次实验, 观察卵细胞 934 个, 平均精子穿透率 71%(33—91%), 平均染

色体出现率为 52%(19—81%), 见表 1 和表 2。

表 1 冷处理组与非冷处理组精子穿透率比较

组 别	被穿透的卵细胞数	未被穿透的卵细胞数
冷处理组	857	201
非冷处理组	658	276
合计	1515	477

$P < 0.001$

表 2 冷处理组与非冷处理组卵细胞内染色体出现率比较

组 别	有染色体的细胞数	无染色体的细胞数
冷处理组	804	254
非冷处理组	482	452
合计	1286	706

$P < 0.001$

上述两个数据经  $X^2$  处理,  $P$  值均小于 0.001, 表明有非常显著差异。

### 2. 四种培养液的对比

共进行了 13 次同时对比, 观察了 1349 个卵细胞。F<sub>10</sub> 液染色体出现率为 77.6%, 分散

表 3 四种培养液培养的卵细胞中染色体出现率比较

培 养 液	有染色体细胞数	无染色体细胞数
F <sub>10</sub>	257	74
199	255	92
卵培养液	246	70
改良 BWW	264	91
合计	1022	327

$P > 0.1$

表 4 四种培养液中扩散好的染色体比较\*

培 养 液	扩散好的染色体	扩散不好的染色体
F <sub>10</sub>	60	197
199	58	197
卵培养液	60	186
改良 BWW	68	196
合 计	246	776

$P > 0.75$

\* 参照张思仲的方法, 将扩散分级定为扩散好指臂交叉 4 次或 4 次以下, 扩散不好指臂交叉 4 次以上<sup>[11]</sup>。

好的染色体为 18.1%；199 液染色体出现率为 73.5%，分散好的染色体为 16.7%；卵培养液染色体出现率为 77.8%，分散好的染色体为 19%；改良 BWW 液染色体出现率为 74%，分散好的染色体为 19.2%，见表 3 与表 4。

这两个数据经  $X^2$  处理， $P$  值均大于 0.1，表明无统计学差异。

国内外一些实验室为了解决卵细胞老化问题，采用了多台解剖镜、多人同时操作、或在有氧罩的 37℃ 恒温工作台上操作等方法<sup>[3,8]</sup>，但这些解决办法均需增加设备和人力。我们认为卵老化的诱因之一是离体细胞因供氧停止，能量供应差造成，老化卵进入实验必然影响受精与染色体的形成。利用低温能使细胞新陈代谢变慢的原理，在卵制备过程中，将输卵管和含卵的颗粒细胞团块放入 4℃ 左右环境中，可适当延长卵的老化时间。通过两组对比表明两组的穿透率与染色体出现率存在着非常显著的差异，说明将卵细胞放置于 4℃ 左右的环境中可减轻卵细胞的老化程度，从而给操作者较充足的时间去制备卵细胞，同时又不增加设备。

在两组穿透率比较中还提示，在评价精子穿透率时，需注意卵细胞的制备，受精过程是精、卵共同的作用，并非完全取决于精子，如果不进行质量控制，将会影响精子穿透率的正确性。

### 3. 关于四种培养液的对比

四种培养液对比结果经  $X^2$  处理后表明它们之间无统计学差异。这一结论与 Kamiguchi 用中国仓鼠的同种受精卵选择最适合精子染色体制备的培养液结论不一致<sup>[6]</sup>。我们认为原因有 3 个：(1) 所用受精卵和授精性质不一样，(2) Kamiguchi 仅做 3 次对比、观察指标是有多少同种受精卵发育到两细胞期。他的重复次数太少，观察指标也不一样。(3) Kamiguchi 未经统计学处理，而是以百分率高低下的结论，不可避免会有机遇性误差。

1987 年 Jenderny<sup>[3]</sup> 和 Martin<sup>[2]</sup> 对 199 液在精子染色体实验中使用提出异议，他们认为 199 缺少叶酸与胸腺嘧啶，对显示脆性染色体有用，若在本实验中使用，会使单倍染色体本身存在的一些空隙和细丝状结构加大，人为造成一些结构异常染色体(图 3)。

综上所述，我们认为在异种受精卵培养中应首先选用 F<sub>10</sub>、卵培养液以及改良 BWW 液。

### 摘 要

本文研究了冷处理金黄仓鼠卵与 4 种不同培养液对人精子单倍染色体制备的影响。冷处理组与未经冷处理组的穿透率与染色体出现率经  $X^2$  处理、 $P < 0.001$ ，表明通过冷处理可适当延长卵的制备时间，减轻卵的老化。4 种不同培养液的染色体出现率与分散好的染色体率对比结果经  $X^2$  处理， $P > 0.1$ ，表明无统计学差异，作者认为四种不同培养液均可用于该实验中，但首先选用 F<sub>10</sub>、卵培养液和改良 BWW 液。

### 参 考 文 献

- [1] Rudark E, et al., 1978, *Nature*, 274: 911—913.
- [2] Martin R. et al., 1987, *Hum Genet.*, 77: 108—114.
- [3] Jenderny J. et al., 1987, *Hum Genet.*, 76: 385—388.
- [4] 杨育州等, 1985, *遗传学报*, 12(2): 159—192.
- [5] 湖南医学院主编, 1978, *生理学*, 第 1 版, 人民卫生出版社, p. 269—270.
- [6] Kamiguchi Y et al., 1986, *Am J Hum Genet.*, 38: 724—740.
- [7] Martin R. et al., 1982, *Am J Hum Genet.*, 34: 459—468.
- [8] Bramdriff B. et al., 1984, *Hum Genet.*, 66: 193—201.
- [9] Dyban A. et al., 1983, *Stain Technol.*, 58: 69—72.
- [10] 马长俊等: 1985, *生殖与避孕*. 5(4): 53—55.
- [11] 张思仲: 1985, *遗传与疾病* 2(1): 29—34.