

教学研究

细胞生物学实验教学改革实践探索——减数分裂前期I染色体的观察

李家祥^{1#} 刘立波^{1#} 魏民² 李晓雪² 曾宪录² 巴雪青² 王若曦^{1*}¹山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; ²东北师范大学生命科学学院, 长春 130026)

摘要 减数分裂(meiosis)是有性生殖生物在生殖细胞成熟过程中发生的特殊分裂方式。与有丝分裂相比, 减数分裂需要保证染色体数目精准减半, 而且同源染色体的部分交换是减数分裂过程中引入基因重组、实现子代个体遗传多样性的结构基础。这些减数分裂特有的事件都与减数分裂前期I的染色体动态变化密切相关。然而, 目前在高校本科生细胞生物学实验教学中, 却无法像有丝分裂观察那样, 普遍开设减数分裂观察实验, 原因在于取材具有较多限制, 并且减数分裂前期I各时期染色体的形态结构很难同时观察到。该文作者根据科研活动积累的经验, 尝试利用秀丽隐杆线虫为材料, 进行减数分裂前期I各时期染色体形态结构的观察。旨在通过教学改革实践探索, 丰富本科生细胞生物学实验教学内容, 使学生更加深刻地理解减数分裂的动态过程以及有丝分裂与减数分裂的差别, 进而深入领会减数分裂对于生命演化的意义。

关键词 细胞生物学实验; 教学改革; 减数分裂; 秀丽隐杆线虫; 染色体

Experimental Teaching Reform of Cell Biology: Observation of Chromosome in Prophase I of Meiosis

LI Jiexiang^{1#}, LIU Libo^{1#}, WEI Min², LI Xiaoxue², ZENG Xianlu², BA Xueqing², WANG Ruoxi^{1*}¹College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China;²College of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130026, China)

Abstract Meiosis is a specialized cell division process that generates haploid gametes from diploid germ cells. Compared with mitosis, meiosis requires an extra set of systems to ensure precise halving of chromosome. Moreover, the partial exchange of homologous chromosomes is the structural basis for the introduction of gene recombination during meiosis and the achievement of individual genetic diversity of offspring. All of these meiosis-specific events are closely related to the process of meiosis prophase I. However, in the current undergraduate experimental teaching of Cell Biology, it is hard to set up meiosis experiments, because of more restricted access to materials and the difficulty of observing the morphological structure of chromosomes in all periods of meiosis I at the same time. Based on the experience accumulated in scientific research, the authors tried to use *Caenorhabditis*

收稿日期: 2021-07-19 接受日期: 2021-09-24

吉林省教育厅高等教育教改研究重点项目(批准号: DBSFDX-20170703)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 18963065720, E-mail: wangrx735@nenu.edu.cn

Received: July 19, 2021 Accepted: September 24, 2021

This work was supported by the Higher Education Reform Key Project of Jilin Provincial Education Department (Grant No.DBSDX-20170703)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-18963065720, E-mail: wangrx735@nenu.edu.cn

elegans as material to observe the morphological structure of chromosomes in each stage of meiosis prophase I. It aims to enrich the teaching content of Cell Biology Experiments for undergraduates through teaching reform and practice. Students will gain a deeper understanding of the dynamic process of meiosis and the difference between mitosis and meiosis, and then gain a deeper understanding of the significance of meiosis for the evolution of life.

Keywords Cell Biology Experiment; teaching reform; meiosis; *Caenorhabditis elegans*; chromosome

细胞增殖是细胞生命活动的基本特征,是生物个体发育、机体修复、种族繁衍的基础。细胞增殖是通过细胞分裂(cell division)的方式来实现的。细胞增殖及调控是细胞生物学课程的重要内容之一。细胞分裂可分为无丝分裂(amitosis)、有丝分裂(mitosis)和减数分裂(meiosis)三种类型。减数分裂是真核生物有性生殖所特有的细胞分裂方式,是产生单倍体配子的过程。减数分裂过程中DNA复制一次,细胞连续分裂两次,即减数分裂分为减数第一次分裂和减数第二次分裂。减数第一次分裂主要是进行同源染色体的分离,可进一步划分为前期I、前中期I、中期I、后期I、末期I和胞质分裂期6个阶段;减数第二次分裂类似于有丝分裂,主要是姐妹染色单体的分离,最终形成配子(即单倍体细胞)^[1-2]。相对于有丝分裂而言,减数分裂还需要额外的体系来确保染色体数目的精准减半以及维持基因组的完整性^[2]。此外,同源染色体的部分交换是减数分裂过程中引入基因重组、实现子代个体遗传多样性的结构基础。这些减数分裂期间发生的一系列特有事件是其区别于有丝分裂的关键所在,均与前期I密切相关。

细胞生物学实验课程是细胞生物学的重要组成部分。在本科生细胞生物学实验教学中,常以洋葱(蚕豆)根尖为材料观察植物细胞有丝分裂过程,也可以通过马蛔虫的子宫切片观察动物细胞有丝分裂过程。这些教学内容加深了学生对有丝分裂理论知识的理解。然而,由于取材困难、实验处理繁琐,减数分裂实验很少在本科生实验教学中开展。我们在科学研究过程中主要以秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)为材料,探究减数分裂过程中关键事件的作用机制^[3-5]。在本科生细胞生物学实验教学中,我们进行探索与尝试,发现秀丽隐杆线虫可以作为很好的模式生物,以用于减数分裂前期I染色体的观察^[6]。

1 实验原理

减数分裂前期I包括细线期(leptotene)、偶线期

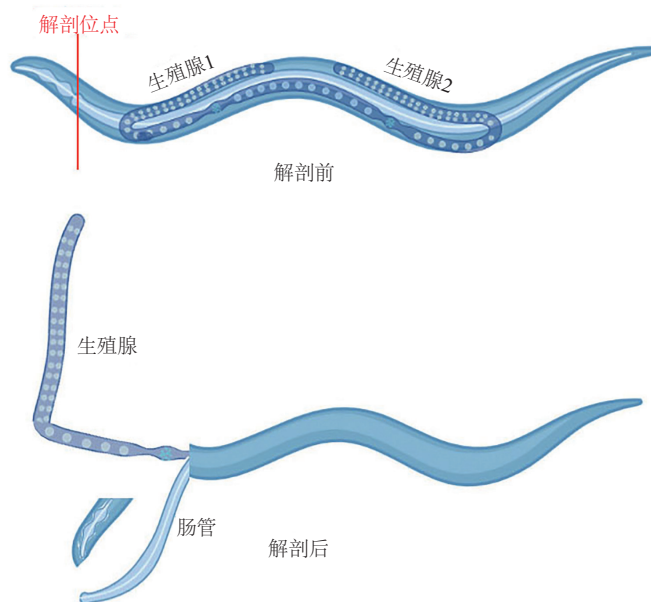
(zygotene)、粗线期(pachytene)、双线期(diplotene)和终变期(diakinesis) 5个时期^[1]。减数分裂前期I发生的生化事件包括同源染色体的配对、联会复合体的形成、遗传交叉以及染色体重塑^[1,3]。在细线期和偶线期阶段,每个染色体通过高度运动识别其同源染色体并且相互对齐,对齐的同源染色体之间开始联会复合体的组装。在粗线期,同源染色体完成配对,并发生等位基因之间部分DNA片段的交换和重组,进而导致同源染色体间发生遗传物质交换^[7]。在双线期,同源染色体开始分离,染色体凝集并相互分离,仅留几处相互联系。终变期时,染色体高度重塑和凝集,形成短棒状结构^[7]。仔细观察减数分裂前期I的染色体形态变化,有助于学生深刻理解减数分裂的过程,明晰减数分裂过程中的关键事件。

秀丽隐杆线虫是有效研究减数分裂的一种模式生物。第一,线虫以大肠杆菌OP50为食,生命周期较短(5天左右),通体透明,组织和细胞在显微镜下极易观察^[8]。第二,雌雄同体的线虫体内含有前后两个生殖腺,并且生殖细胞数目占总体细胞数目的一半(图1)^[1-2,9]。第三,线虫染色体数目(雌雄同体 $2n=12$,雄性 $2n=11$)较少,线虫生殖腺内的生殖细胞呈现出一种时间和空间梯度的排列方式,减数分裂前期I的各个阶段——细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期均可以在单个生殖腺内观察到^[1-2]。因此,我们首先解剖线虫生殖腺(图1)^[6],再利用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)这种能够与DNA强力结合的荧光染料来标记线虫生殖腺内的生殖细胞,这样便可清晰地观察减数分裂前期I各个阶段染色体的形态。

2 教学设计与安排

2.1 教学目的

本实验将以秀丽隐杆线虫作为实验材料,通过显微镜观察使本科生掌握减数分裂前期I各时期染色体的形态,并明确染色体形态变化的意义。同时,在实验过程中,使本科生熟悉和掌握秀丽隐杆线虫



雌雄同体的秀丽隐杆线虫体内含有前后两个生殖腺, 其生殖细胞数目占总细胞数目的一半, 将线虫成虫放置于解剖液中, 从线虫头部(即第二个咽球部位, 红色线位置)切开。由于刀口导致线虫体内的渗透压降低, 促使线虫生殖腺弹出。

C. elegans carries two U-shaped gonad arms. These gonad arms take up most of the internal cavity of the worm in adulthood. To extrude the gonad arms, the animal is immobilized in dissection buffer and cut behind the second pharyngeal bulb (red line). Loss of turgor pressure inside the animal because of the cut results in extrusion of one of the two gonads.

图1 线虫生殖腺解剖示意图

Fig.1 Schematic diagram of *C. elegans* gonad dissection

生殖腺的制片方法以及荧光显微镜的使用方法, 并进一步了解线虫作为模式生物的优势。

2.2 教学重点与难点

教学的重点是使本科生能够区分减数分裂前期I各时期染色体的形态, 并理解减数分裂前期I染色体形态变化的意义。教学难点在于提高学生的实验操作能力, 因为想要观察完整的线虫生殖腺, 需要将线虫头部或尾部切除使生殖腺完全弹出而不被破坏, 且需要掌握一定的力度。另外, 学生需要熟练掌握荧光显微镜的使用方法, 为了更好地观察染色体形态需要在63×油镜下拍摄线虫生殖腺。

2.3 教学安排

2.3.1 学时安排 本实验可以分为3个阶段, 可根据学生水平以及实验条件, 选择由学生完成全部实验或者由学生完成部分实验。(1) 线虫成虫识别与挑取(4学时); (2) 解剖线虫生殖腺并染色制片(4学时); (3) 荧光显微镜拍摄以及数据处理(4学时)。本实验前后连续, 总共12学时, 通过3个阶段的实验后, 学生需书写一份完整的实验报告。

2.3.2 实验分组 实验中每组4人, 学生在实验过程中相互讨论, 共同协作完成该实验项目。

2.4 实验材料与设备

2.4.1 实验材料 本实验用到的线虫品系为Bristol Strain N2(wild type)、*htp-3::gfp*[CGC(Caenorhabditis Genetics Center)获取]。大肠杆菌为OP50。

2.4.2 实验仪器和用具 实验仪器和用具包括: 培养箱(Thermo)、体式显微镜(南京江南永新光学有限公司)、解剖刀、解剖刀柄、染色缸、黏附性载玻片(江苏世泰实验器材有限公司)、黏附性盖玻片(VWR)、挑虫针、金属浴架子、移液器、正置荧光显微镜(Leica)。

2.5 试剂配制

(1) 1 mol/L磷酸钾缓冲液: 称取108.3 g KH_2PO_4 和35.6 g K_2HPO_4 , 使其溶于1 000 mL ddH₂O中, 调节pH值到6.0即可。

(2) NGM培养基: 将2 g蛋白胨(peptone, Gibco)、16 g琼脂、2.4 g NaCl置于洁净的1 000 mL三角锥形瓶中, 加入20 mL磷酸钾缓冲液(1 mol/L), 蒸馏水定容至800 mL(此混合物为初始培养基), 120 °C高压灭菌30 min。待冷却至50~60 °C时, 依次加入5 mg/mL胆固醇(乙醇溶解, 不灭菌) 0.8 mL, 高压灭菌的1 mol/L MgSO_4 、1 mol/L CaCl_2 各0.8 mL, 摇匀即得到完全培

培养基。用移液管将约0.05 mL大肠杆菌OP50液体培养物涂在60 mm NGM平板上。

(3) 0.5 mol/L叠氮化钠(NaN_3 , Sigma): 称取3.25 g NaN_3 , 溶于100 mL ddH_2O 中, 于室温通风橱放置, 可长期保存。

(4) 10× 卵缓冲液(EGG buffer): 称取6.9 g NaCl 、3.58 g KCl 、0.49 g $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.29 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.5 mL羟乙基呱嗪乙硫磺酸溶液(HEPES, pH7.4, 1 mol/L)溶于双蒸水中, 定容至100 mL, 4 °C贮存备用, 可保存1~2个月。

(5) 解剖液: 量取5 mL 10× EGG缓冲液, 0.5 mL 10%吐温-20, 1.5 mL NaN_3 (0.5 mol/L), ddH_2O 定容至100 mL。

(6) 固定液的配制: 量取1 mL 10× PBS、800 μL HEPES(1 mol/L)、16 μL EDTA(0.5 mol/L)、1.08 mL 37%的多聚甲醛、16 μL MgSO_4 (1 mol/L), ddH_2O 定容至10 mL, 4 °C贮存备用, 可保存一周。

(7) PBST: 量取1 mL吐温-20、10 mL 10× PBS, ddH_2O 定容至100 mL, 4 °C贮存备用。

(8) DAPI: 先将5 μL DAPI原液(5 mg/mL, Invitrogen)加入到200 μL ddH_2O 中以溶解稀释DAPI, 再用PBST定容至50 mL, 4 °C避光贮存备用。

(9) 10 mol/L Tris-HCl(pH7.4): 称取0.12 g Tris, 用60 mL ddH_2O 溶解, 调节pH至7.4, 然后定容至100 mL, 4 °C贮存备用。

(10) 实验试剂还包括甲醇(天津市富宇精细化工有限公司)以及封片剂(VECTASHIELD)。上述所用常规试剂均购于Solarbio。

3 实验步骤

3.1 秀丽隐杆线虫的饲养

线虫主要以大肠杆菌OP50为食, 生长在涂有OP50菌液的NGM培养基上, 首先用挑虫针尖端底端蘸取一团OP50, 然后用带有OP50的挑虫针轻且快速地碰触线虫, 通过OP50的黏性将线虫粘住。将挑虫针的尖端轻轻靠近琼脂的表面, 并保持一段时间, 让线虫爬出挑虫针, 完成线虫传代的过程。线虫通身透明, 生命周期为5天, 在20 °C条件下可以存活3~4周, 其胚胎形成大约需要16 h, 从出生到性成熟只需3.5天左右, 其卵在孵化后经历4个幼虫期(L1~L4), L1阶段约维持16 h, 其他阶段约维持12 h, L4时雌雄同体线虫开始产生精子, 蜕皮12 h后进入成虫期并开始产卵,

产卵期可以维持2~3天, 直到它们用尽自己产生的精子。产卵期过后秀丽隐杆线虫仍可以存活数周。

课前准备: 线虫的复苏(从-80 °C冰箱取出并复苏线虫, 传代两次)以及该实验过程中所需试剂均为教师提前配制。

3.2 秀丽隐杆线虫的解剖

吸取20 μL 的解剖液滴至黏附性盖玻片上。在体式显微镜下用挑虫针一次性挑取20~30只成虫放入解剖液中。

显微镜下, 使用解剖刀将线虫颈部切断。刀口导致线虫体内的渗透压降低使得生殖腺弹出。生殖腺全部弹出之后, 用移液器将其转移至新的黏附性盖玻片上, 尽量不要留多余的液体。

黏附性载玻片在上面, 轻轻吸附盖玻片, 完成后迅速将盖玻片朝上。将其置于预先放置于干冰中的金属浴架子上, 按压数10 s后用刀片把盖玻片撬掉。低温处理使生殖腺贴附于载玻片上。

3.3 秀丽隐杆线虫的固定

先用预冷好的甲醇固定载有生殖腺的载玻片1 min, 轻轻擦拭样品两侧的甲醇。在样品上加入600~800 μL 固定液, 避光孵育30 min(防止固定液挥发, 可将片子放入避光湿盒内)。

3.4 DAPI染色

取出玻片, 放入含有50 mL 1× PBST的染色缸中浸泡5 min。随后进行DAPI染色, 取出玻片, 放入DAPI染色缸中, 避光染色5 min。

3.5 制片及显微镜观察

取出玻片, 放入PBST染色缸中清洗三次, 每次清洗10 min。此步骤是为了清洗掉与细胞非特异性结合的DAPI染料, 时间长短可以依据实验结果调整。随后将玻片放入10 mmol/L Tris-HCl溶液(pH7.4)中浸泡1 min。将玻片控液并轻轻擦拭样片周围的液体后, 在玻片临近样品一侧滴加10 μL 封片剂, 将盖玻片沿一侧轻轻放下。室温放置5 min晾干, 用指甲油封片。玻片可在4 °C条件下保存1个月。在正置/倒置荧光显微镜下, 选用DAPI(405 nm)通道进行观察并拍照。本实验的整体操作流程见图2。

4 实验结果

4.1 低倍镜(20×)下观察线虫生殖腺

在低倍镜下找到线虫生殖腺, 教师指导学生使用荧光显微镜, 并明确线虫生殖腺的形态。如图3

所示, 我们可以清晰地显微镜下观察到线虫的生殖腺, 但是由于放大倍数的原因无法观察到每个细胞核的形态, 需进一步转换高倍镜观察。在图3A中,

后期DAPI染色较浅, 主要是由于线虫生殖腺呈时间和空间梯度的排列方式, 处于双线期、终变期的细胞较少, 且染色体凝集化。为了让学生们更清晰地

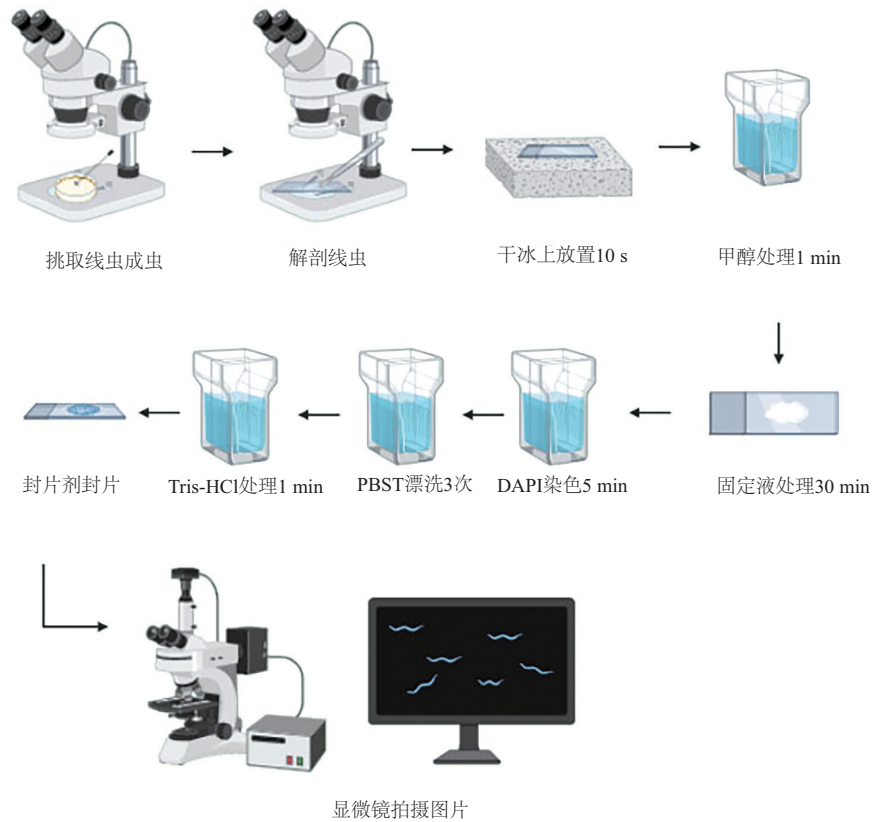
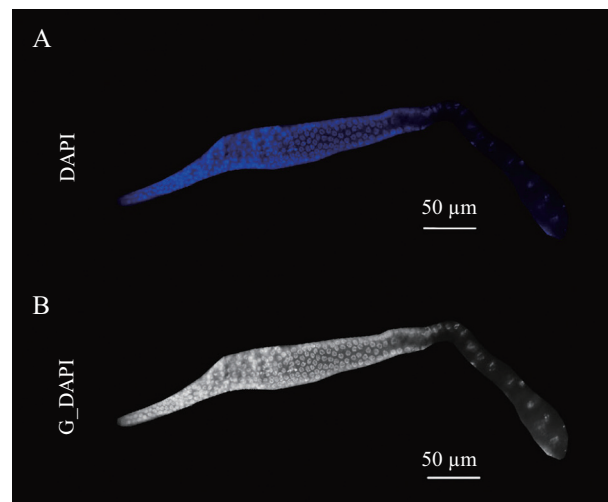


图2 减数分裂前期I染色体观察的实验流程图

Fig.2 Schemes of chromosome observation in prophase I of meiosis



A: 20× 荧光显微镜下拍摄的完整线虫生殖腺(N2线虫株)。选在DAPI(405 nm)通道下进行观察并拍照。B: 对图A进行的灰度处理。

A: immunofluorescence microscopy visualize DAPI staining of *C. elegans* gonad at DAPI (405 nm) channel (20×) (wild type). B: grayscale process of image A.

图3 *C. elegans*生殖腺DAPI染色图

Fig.3 DAPI staining of *C. elegans* gonad

观察线虫生殖腺,采集图片后利用photoshop进一步处理数据,转化为灰度照片更利于我们观察减数分裂前期I的染色体形态(图3B)。

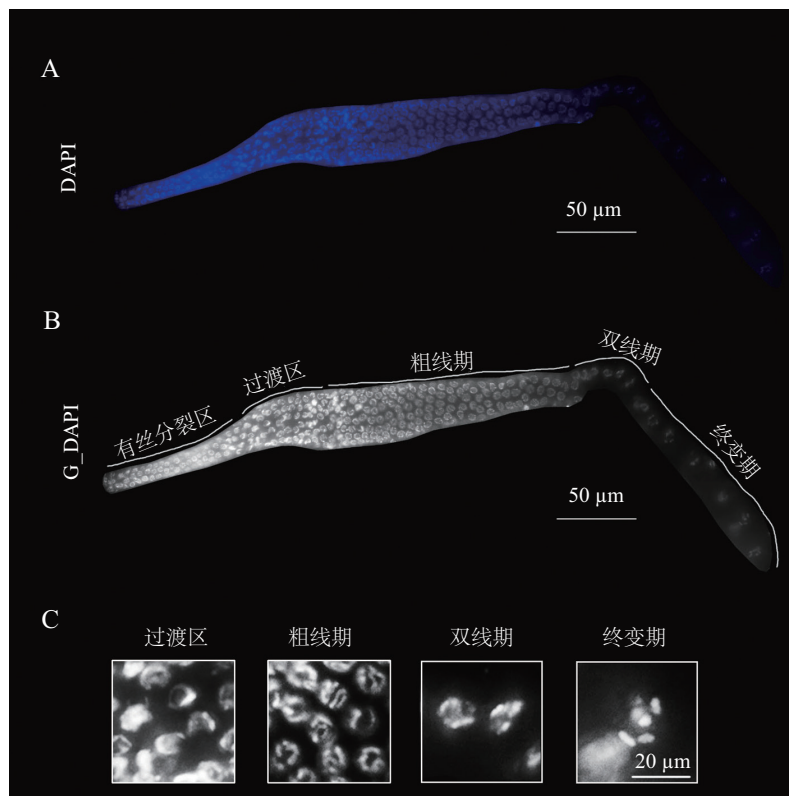
4.2 40× 荧光显微镜下观察减数分裂前期I染色体形态

在低倍镜下找到生殖腺后,转换为高倍镜观察减数分裂前期I各时期染色体的形态变化。图4A显示的是完整生殖腺的拼接图,实际在40× 荧光显微镜下观察时,我们不能看到整条生殖腺,而仅能看到局部。在拍摄时可以沿着生殖腺将其全部拍摄完成后拼接。为了更明晰地观察线虫减数分裂前期I的染色体形态,我们可以将图片转化成灰度(图4B)。图4C是分别截取各个时相的放大图,有助于我们进一步观察。结合图4B和图4C,我们可以观察到减数分裂前期I的各个时相。整个生殖腺以有丝分裂区(mitotic zone)为起始区,经过有丝分裂到减数分裂的过程转换,细胞开始进入减数分裂。

过渡区(transition zone, TZ)是细线期和偶线期的细胞核,染色质紧密聚集在细胞核的一侧,形成明显的半月形状,这种结构的形成使染色体聚集在更小的空间内,从而增加染色体配对的几率,促进同源染色体重组^[2]。当细胞进入粗线期时,可以看到同源染色体成对排列均匀分布在每个细胞核的周围。转移至双线期(diplotene)的细胞染色体凝聚,在此阶段6个独立的染色体结构逐渐变得可见。终变期(diakinesis)染色体高度凝集,在细胞核内可以清晰地观察到6条染色体。在解剖过程中,并不能确保所有生殖腺都能完整的弹出,但是这并不影响我们观察减数分裂前期I各个阶段,我们可以直接依据染色体形态来分析其所在时期。

4.3 高倍镜(63×)下观察减数分裂前期I染色体形态

如果本科生实验设备拥有63× 镜头的显微镜,可以进一步在63× 荧光显微镜下观察减数分裂前期I的染色体的形态变化。图5A显示的是63× 荧光显

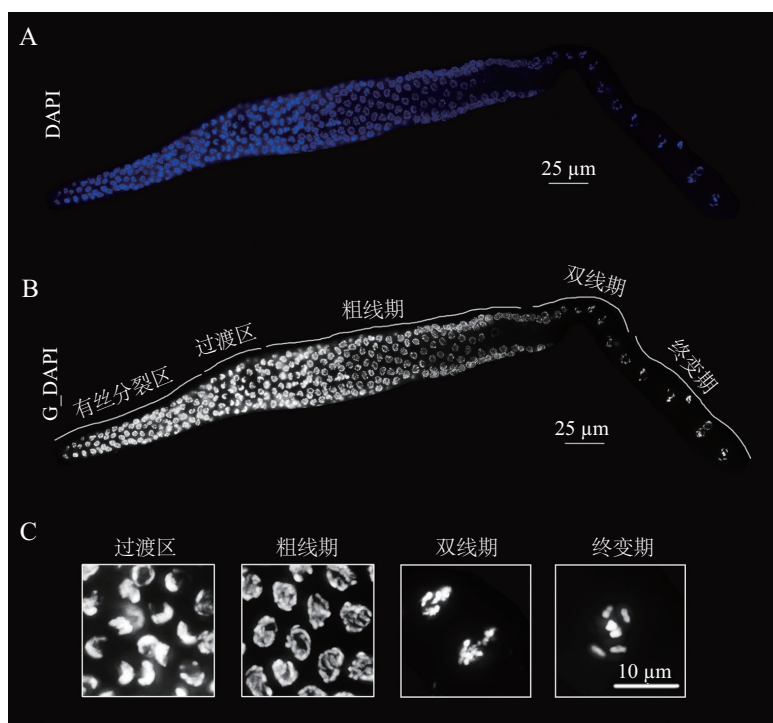


A: 40× 荧光显微镜下拍摄线虫生殖腺的DAPI染色(N2线虫株)。B: 将图A进行灰度处理,并标注减数分裂前期I的各个时期(处理方法同图3B)。C: 图B中过渡区、粗线期、双线期以及终变期各个时相细胞放大图。过渡区包括细线期和偶线期。

A: immunofluorescence microscopy visualize DAPI staining of *C. elegans* gonad at DAPI (405 nm) channel (40×) (wild type). B: grayscale process of image A and mark the various periods of meiosis prophase I (same with Fig.3B). C: enlarged views of cells in each time phase of the transition zone, pachytene, diplotene and diakinesis in image B. The transition zone includes leptotene and zygotene.

图4 *C. elegans*生殖腺DAPI染色图

Fig.4 DAPI staining of *C. elegans* gonad



A: 63× 荧光显微镜下拍摄线虫生殖腺的DAPI染色(N2线虫株)。B: 将图A进行灰度处理, 并标注减数分裂前期I的各个时期(处理方法同图3B)。C: 图B中过渡区、粗线期、双线期以及终变期各个时相细胞放大图。过渡区包括细线期和偶线期。
A: immunofluorescence microscopy visualize DAPI staining of *C. elegans* gonad at DAPI (405 nm) channel (63×) (wild type). B: grayscale process of image A and mark the variou periods of meiosis prophase I (same with Fig.3B). C: enlarged views of cells in each time phase of the transition zone, pachytene, diplotene and diakinesis in image B. The transition zone includes leptotene and zygotene.

图5 DAPI染色观察减数分裂前期I染色体形态

Fig.5 DAPI staining to observe the chromosomes morphology of meiotic prophase I

显微镜下观察完整生殖腺的拼接图, 图5B是其灰度处理图。对比图4B和图5B以及图4C和5C, 我们可以发现, 在63× 荧光显微镜下我们可以更加清晰地观察减数分裂前期I染色体的变化。过渡区细胞染色体聚集在细胞核一侧, 呈现明显的半月形。在粗线期同源染色体联会, 形态同面条一样, 因此我们将粗线期细胞形象地称为“一碗意大利面”^[10]。当细胞进入双线期时, 染色体开始固缩, 我们可以观察到分散独立的染色体结构。当细胞进入终变期后, 染色体高度凝集, 我们可以清晰地观察到6个分散独立的染色体。

4.4 利用GFP荧光转基因线虫观察减数分裂前期I染色体形态

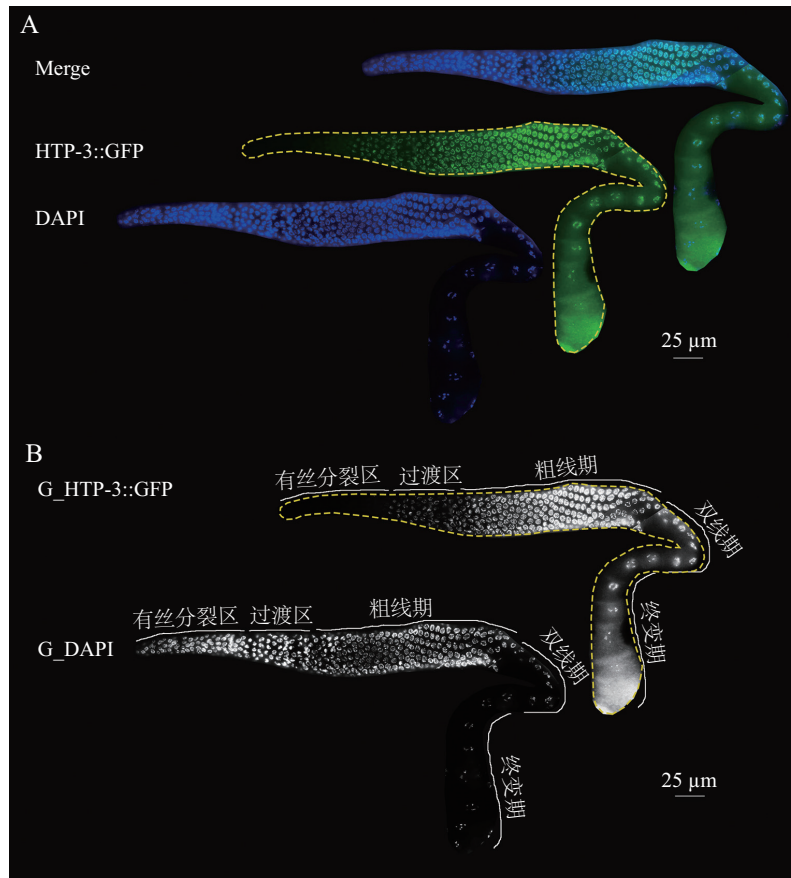
为了更加形象直观地观察减数分裂前期I染色体的形态变化, 可以选用转基因品系线虫, 例如 $htp-3::gfp$ 线虫株, HTP-3是减数分裂特异性蛋白, 是联会复合体侧向组分的核心组分。HTP-3最早组装到联会复合体上, 随着联会复合体的聚合和解聚成高度动态变化。因此, 可以解剖 $htp-3::gfp$ 线虫, 然后在

DAPI(408 nm)以及GFP(488 nm)通道下同时拍摄并观察染色体变化。图6展示的是63× 荧光显微镜下拍摄的 $htp-3::gfp$ 线虫生殖腺, 我们可以对比GFP通道和DAPI通道来明确HTP-3在染色体上的动态变化。在细线期和偶线期时, HTP-3开始在组装到染色体轴上。在粗线期时, HTP-3在联会复合体上完全装载。在双线期和终变期时, HTP-3随着染色体的固缩在染色体上重新排布, 最终定位在染色体的长短臂上(20×、40× 荧光显微镜下拍摄图未展示)。

5 讨论

5.1 开设该实验项目的意义

减数分裂是生物有性生殖的基础, 是生物遗传和演化以及生物多样性的重要保证。减数分裂前期通过一系列特有事件来保证染色体的精准分离, 这些特有事件包括同源染色体配对、联会复合体组装、遗传交叉以及染色体重塑等, 任意一个环节的错误都会导致减数分裂过程中染色体的异常分离, 进而导致不孕不育、流产和新生儿缺陷等问



A: 63× 荧光显微镜下拍摄 $htp-3::gfp$ 线虫生殖腺的免疫荧光图(GFP和DAPI双通道)。B: 将图A进行灰度处理,并标注减数分裂前期I的各个时期。过渡区包括细线期和偶线期。黄色虚线表示一个完整线虫的生殖腺。

A: immunofluorescence microscopy visualize GFP and DAPI of $htp-3::gfp$ gonad at GFP (488 nm) and DAPI (405 nm) channel (63×). B: grayscale process of image A and marking of the various periods of meiosis prophase I. The transition zone includes leptotene and zygotene. The yellow dashed line indicates the complete *C. elegans* gonad.

图6 $htp-3::gfp$ 线虫生殖腺DAPI染色图

Fig.6 DAPI staining of $htp-3::gfp$ gonad

题^[2,11-12]。

现用于减数分裂实验的模式生物有蝗虫、植物(玉米、蚕豆)等^[13],由于取材以及观察具有一定的局限性,以上模式生物并没有在本科生实验教学中得到推广。例如,蝗虫巢集生殖细胞减数分裂需要采集正在交配期间的蝗虫,一般以九月份(阳历)的雄蝗虫为宜,此时的生殖细胞大量分裂易于观察减数分裂的全过程^[14];植物减数分裂材料的收集需要在春季(植物材料开花季节),此外,玉米花粉母细胞减数分裂基本同步,需要大量制片才能观察到减数分裂的各个时相^[15]。线虫作为研究减数分裂实验的模式生物具有独特优势。首先,线虫饲养方便,取材容易且不受时间限制。其次,线虫染色体数目较少,且线虫生殖腺内的生殖细胞呈时间和空间梯度的排列,减数分裂前期I的各个阶段易于观察。再

次,实验操作相对比较简单,在显微镜下,使用解剖刀将线虫颈部切断,使生殖腺弹出即可。我们减数分裂前期I染色体形态观察实验项目的开展,一方面可以让学生直观的观察减数第一次分裂前期I染色体的形态变化,明晰减数分裂与有丝分裂的区别;另一方面也可以使学生通过学习,将染色体形态变化与减数分裂过程中的关键事件相联系,加深对减数分裂的理解。此外,通过该项目的学习,可培养学生独立操作(线虫培养、解剖、制片等)能力,使其熟练使用荧光显微镜,并学会使用photoshop对图片进行简单处理。

5.2 实验项目的可行性

(1) 低成本性。细胞培养要求无菌操作,其相应仪器设备要求比较严格。相较于细胞培养而言,线虫培养仅需要20℃恒温培养箱,成本比较低。(2) 易

观察性。线虫生殖腺内的生殖细胞呈现出一种时间和空间梯度的排列方式, 减数分裂前期I各时相染色体的形态变化特别容易捕捉。(3) 易操作性。本实验室以秀丽隐杆线虫为研究减数分裂的模式生物, 探究减数分裂染色体精准分离以及基因组完整性的调控机制, 该实验在本实验室研究生以及本科生中广泛开展, 实验步骤操作简单, 实验结果易于获得。

5.3 实验的可调整性

(1) 实验安排的可调整性。该实验可以根据各高校实验条件以及课时安排选择由学生完成全部实验或者由学生完成其中部分实验, 具有可调整性。实验前期为教师讲解, 教师通过播放PPT、制作视频等方式讲授线虫培养的操作方法、线虫解剖的注意事项以及荧光显微镜的使用方法。同时, 在讲授过程中提出问题“为什么在减数分裂前期I过程中染色体会存在形态学的显著变化? ”。让学生们带着问题开展实验, 加深其对问题的理解。学生实验过程中, 以小组为单位, 老师从旁指导。课后, 学生根据实验结果书写一份实验报告。此外, 结合实验结果以及文献阅读解答老师提出的问题, 作为该实验项目的讨论内容。(2) 实验内容的可调整性。该实验中在40×以及63× 荧光显微镜下均可以观察到减数分裂前期I染色体的变化, 高校可以依据自身实验条件来选择目镜。另外, 多色荧光转基因线虫可以增加实验中的测量参数(图6), 充分展示减数分裂特点, 高校可以利用所拥有的荧光转基因线虫来进行扩展实验。

5.4 实验的推广和应用

本实验利用秀丽隐杆线虫为实验材料, 其培养条件简单, 操作容易, 成本低, 易于观察, 为本科生实验教学提供了极大的便利。荧光显微镜观察在生命科学领域应用广泛, 绝大多数高校平台均配备该实验设备, 便于在高校细胞生物学实验课中开展该实验。另外, 该实验操作具有可调整性, 成片可以长时间保存, 为实验课的开展提供了有利的保障。值得注意的是, 该实验项目对教师有一定要求, 需要教师掌握线虫培养、解剖、制片的实验流程, 并能熟练掌握显微镜的操作技术。科研是教学的支撑, 教学是科研的基础。目前的教育模式要求大学教学

者科教相容, 鼓励教师根据自身科研经历和经验开发新的实验教学内容, 这样才能更好地将科研成果转化为教学服务。

参考文献 (References)

- [1] HILLERS K J, JANTSCH V, MARTINEZ-PEREZ E, et al. Meiosis [M]. Wormbook, 2017, 1-43.
- [2] 陈苗. 线虫中新型联合复合体组分的发现及功能研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2020.
- [3] GAO J, COLAIACOVO M P. Zipping and unzipping: protein modifications regulating synaptonemal complex dynamics [J]. Trends Genet, 2018, 34(3): 232-45.
- [4] ZHANG Z, XIE S, WANG R, et al. Multivalent weak interactions between assembly units drive synaptonemal complex formation [J]. J Cell Biol, 2020, 219(5): e201910086.
- [5] LIU Y, ZHAO Q, NIE H, et al. SYP-5 regulates meiotic thermotolerance in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Mol Cell Biol, 2021, doi: 10.1093/JMCB/MJAB035.
- [6] MINOGUE A L, ARUR S. *In situ* hybridization for detecting mature MicroRNAs *in vivo* at single-cell resolution [J]. Curr Protoc Mol Biol, 2019, 127(1): e93.
- [7] 翟中和, 王喜忠, 张传茂, 等. 细胞生物学, 4版[M]. 北京: 高等教育出版社, 2020, 278-83.
- [8] KALETSKY R, MURPHY C T. The role of insulin/IGF-like signaling in *C. elegans* longevity and aging [J]. Dis Model Mech, 2010, 3(7/8): 415-9.
- [9] TAKANAMI T, ZHANG Y, AOKI H, et al. Efficient repair of DNA damage induced by heavy ion particles in meiotic prophase I nuclei of *Caenorhabditis elegans* [J]. J Radiat Res, 2003, 44(3): 271-6.
- [10] 邹方东, 苏都莫日根, 王宏英, 等. 细胞生物学实验指南, 3版[M]. 北京: 高等教育出版社, 2020, 137-8.
- [11] HASSOLD T, HALL H, HUNT P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going [J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(R2): R203-8.
- [12] CAPALBO A, HOFFMANN E R, CIMADOMO D, et al. Human female meiosis revised: new insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics and time-lapse imaging [J]. Hum Reprod Update, 2017, 23(6): 706-22.
- [13] 安利国, 邢维贤. 细胞生物学实验教程, 3版[M]. 北京: 科学出版社, 2015, 52-54.
- [14] 徐根娣, 陈析丰, 柯卡茹. 减数分裂实验材料的优化与染色体制备技术改进[J]. 生物学杂志(XU G D, CHEN X F, KE K R. The optimization of experimental material for the meiotic division and technical improvement on chromosome preparation [J]. Journal of Biology), 2014, 31(1): 100-2.
- [15] 高居荣, 宋雪皎, 王树芸, 等. 花粉母细胞减数分裂细胞及染色体变化研究[J]. 实验室科学(GAO J R, SONG X J, WANG S Y, et al. Study on the changes of cells and chromosomes in pollen mother cells meiosis [J]. Laboratory Science), 2017, 20(6): 6-9.