

研究简报

应用冷冻割断法研究鱼类卵母细胞生长的制样方法

王爱民 张起麟*

(新疆大学生物系, 乌鲁木齐 830046)

A FREEZE-CRACKING METHOD FOR STUDYING THE GROWTH OF OOCYTES OF FISH

Wang Aiming and Zhang Qilin

(Department of Biology, Xinjiang University, Urumqi 830046)

关键词 扫描电镜, 冷冻割断法, 卵母细胞, 鱼类

Key words Scanning electron microscopy, Freeze-cracking method, Oocytes, Fish

生物样品制备技术的改进和发展, 使扫描电镜能够观察生物组织内部结构^[1,2]; 但对生物组织内部结构观察的制样方法多是针对较小细胞组成的实质组织和器官, 而对鱼类卵母细胞(尤其是生长和成熟期)这种大型细胞构成的卵巢的制样方法则无报道。本文以越南鱼(*Tilapia mossambica*)为主, 介绍冷冻割断对鱼类卵巢制样, 置扫描电镜下观察卵母细胞生长及内部结构变化的方法。

材料与 方法

参照 DMSO 冷冻割断法^[3], 根据鱼类卵巢的特殊性及实验条件作少量变动。

活体解剖越南鱼取出卵巢, 直接置于 1% 锇酸 (0.1mol/L 磷酸缓冲液, pH7.4), 4℃ 固定 5h, IV 期卵巢切成 1.5cm 的小段固定。用磷酸缓冲液清洗固定样品 4 次, 每次 30min。再用二甲基亚砜 (DMSO) 12.5%, 25% 和 50% 的水溶液依次各处理两次, 每次 45min 进行防冻处理; 在自制冷冻割断装置中注满液氮, 迅速将冷冻过的卵巢置于割断台上, 用吸管将 50% DMSO 滴在样品周围, 使样品固化包埋, 随之把预冷的刀片

轻放在欲割断的部位。用木锤叩击刀片背, 使样品割断; 收集割断组织投入 50% DMSO 中融解, 随后再投入 50%, 25% 和 1.25% DMSO 中逐渐置换 DMSO; 用磷酸缓冲液清洗(约 12h), 中间换 3—5 次缓冲液。0.1% 锇酸固定 48h, 换固定液 4—5 次, 再用磷酸缓冲液清洗 3—5 次。再将样品进行乙醇脱水, 各 50min, 100% 乙醇两次; 乙醇: 醋酸异戊酯 (1:1) 45min, 100% 醋酸异戊酯 50min 或更长。常规临界点干燥, 真空喷镀金膜, 置日立 S-450 型扫描电镜观察。

结果与 讨论

目前研究鱼类卵母细胞生长过程的超微结构变化大多采用透射电镜^[4,5]。但由于充分生长的卵母细胞直径可达 2—3mm, 卵黄和卵膜对固定液和包埋剂渗透的抑制作用, 使制样困难较大。传统的石蜡切片法也因制样过程中固定、脱水、透明、包埋等步骤对卵黄物质的影响使样品收缩变

* 武汉大学分析测试中心工作。本研究是在武汉大学吴熙载、何海平教授指导下完成的。特表谢意。

1991 年 7 月 23 日收到。

脆,切片不完整或产生裂痕,但冷冻割断法制样可弥补上述不足。

冷冻割断卵巢,可使大多数卵母细胞断开,清晰地显示其全貌(图版 1:1),容易找出所需结构,比从卵巢中挑出较大的卵母细胞进行割断成功率高,节省人力、物力和时间,操作方便,同时能保持其自然状态。卵母细胞和周围的颗粒细胞清晰(图版 1:2),颗粒细胞和卵母细胞形成的绒毛相互交错穿过辐射带,同时显示了卵母细胞皮层区的皮层泡。卵母细胞内的卵黄球和卵母细胞外的辐射带层次清楚(图版 1:3.4)。扫描电镜观察图象立体感强,生动逼真。

由于本法所制样品比常规法大得多,卵母细胞内卵黄及胞外卵膜都可能阻止固定液、脱水剂和防冻剂的渗透,故通过延长处理时间来增加渗透作用。防冻剂 DMSO 的处理要完全,否则会使细胞内或细胞间产生大量冰晶,破坏其结构和改变原来的位置。为了增加固定液、脱水剂和防冻剂的作用,还可用细针在卵巢上戳一定数量的小孔。在固定包埋卵巢时,可将 50% DMSO 直接滴在样品周围,形成一保护层后即可割断。样品

制备完成后应尽快观察拍照,否则放置时间太长时间会影响结构状态,出现卵黄球塌陷等现象。

修改后的 DMSO 割断法,对于研究鱼类卵母细胞生长及内部结构是一种有效的方法。

参 考 文 献

- [1] Haggis G H. SEM contribution to viewing internal cell structure. *Scanning Electron microscopy*, 1982, 2:751—763.
- [2] Tanaka K, Naguro T. High resolution scanning electron microscopy of cell organelles by a new specimen preparation method. *Biomed. Res.*, 1981, 2:63—70.
- [3] 田中敬一、永谷隆编,李文镇等译。图解扫描电镜——生物样品制备。北京: 科学出版社, 1984: 69—70。
- [4] Begovac P C, Wallace R A. Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*. *J. Morphol.*, 1988, 197:353—369.
- [5] Droller M J, Roth T F. An electron microscopic study of yolk formation during oogenesis in *Lebistes reticularis*. *J. Cell Biol.*, 28:209—232.