

网络出版时间:2012-05-22 16:35

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120522.1635.025.html>

小鼠初级精母细胞减数分裂前期联会复合体观察

汪虹英^a, 蔡欣^b

(西南科技大学 a 材料科学与工程学院, b 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010)

[摘要] **【目的】**通过 SCP3 蛋白免疫荧光染色法,研究小鼠初级精母细胞减数分裂前期 I 不同分裂相联会复合体的形态变化。**【方法】**从小鼠睾丸取曲细精管,用铺展法制片,对初级精母细胞 SCP3 蛋白进行免疫荧光染色,观察减数分裂前期 I 不同分裂相联会复合体的形态变化。**【结果】**在细线期,可见短小、不连续而杂乱簇聚的 SCP3 蛋白片段;在偶线期,SCP3 蛋白趋于明显,连续并呈线状,但没有形成完整的联会复合体;在粗线期,SCP3 蛋白结构完整而清晰,小鼠初级精母细胞联会复合体共有 20 条,包括 19 条常染色体联会复合体和 1 条 XY 联会复合体;双线期,构成联会复合体的 2 条 SCP3 蛋白开始相互排斥而分离,导致联会复合体开始解体,但此时的二价体结构依然清晰可见。**【结论】**SCP3 蛋白免疫荧光染色是研究减数分裂前期 I 不同分裂相联会复合体形态变化的强有力工具。

[关键词] 免疫荧光染色;SCP3 蛋白;减数分裂前期 I 不同亚期;小鼠初级精母细胞

[中图分类号] Q234;Q343.2⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)06-0019-04

Observation of synaptonemal complex during meiotic prophase in mouse primary spermatocytes

WANG Hong-ying^a, CAI Xin^b

(a School of Materials Science and Engineering, b School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010, China)

Abstract: **【Objective】** This study is aimed to display the morphological changes of synaptonemal complex during different substages of meiotic prophase I. **【Method】** Seminiferous tubules were shredded from mouse testis and the released spermatocytes were spread evenly over microscope slides. Immunofluorescence staining of SCP3 was employed to exhibit the transformation in morphology of synaptonemal complexes occurring during different substages of meiotic prophase I in mouse primary spermatocytes. **【Result】** Short, discontinuous and randomly converging SCP3 segments were observed in leptotene. In the subsequent zygotene, SCP3 appeared to be distinguishable, continuous and lineal, while no integral synaptonemal complexes were discerned. During pachytene, SCP3 became fully integral and clearly distinguishable. Totally 20 synaptonemal complexes were observed, including 19 autosomes and one XY bivalents. In diplotene, the SCP3 in two lateral elements began to expel and separate from each other, resulting in desynapsis while still retaining the distinguishable 20 bivalents. **【Conclusion】** Immunofluorescence staining of SCP3 could be one powerful technique to exhibit the morphological changes of synaptonemal complex during different substages of meiotic prophase I.

Key words: immunofluorescence staining; SCP3 protein; different sub-stages of meiotic prophase I; mouse primary spermatocytes

* [收稿日期] 2011-12-08

[基金项目] 西南科技大学博士研究基金项目(06zx7121)

[作者简介] 汪虹英(1975—),女,甘肃漳县人,助教,主要从事有机化学与生物化学研究。E-mail: wanghongying0816@126.com

[通信作者] 蔡欣(1972—),男,甘肃漳县人,副教授,硕士生导师,主要从事动物遗传学研究。E-mail: caixin2323@126.com

SCP3 蛋白(Synaptonemal complex protein 3, 联会复合体蛋白)是构成联会复合体(Synaptonemal complex, SC)侧成分(Lateral element)的核心结构,它提供一种类似于分子框架的结构,供其他蛋白质结合于侧成分上。同时,SCP3 蛋白还具有调节 DNA 结合及姐妹染色单体聚合、联会、重组的功能^[1-3]。因此,SCP3 蛋白表达水平及其蛋白结构的异常会导致减数分裂不能正常进行,进而导致精子发生失败和无精症状^[4-6]。根据初级精母细胞形态的变化,可以将减数分裂前期 I 划分为 5 个亚期(Substages),即细线期(Leptotene)、偶线期(Zygotene)、粗线期(Pachytene)、双线期(Diplotene)和终变期(Diakinesis),其中从偶线期开始可见明显的联会复合体;而作为构成联会复合体侧成分核心结构的 SCP3 蛋白形态的变化,是联会(Synapsis)过程乃至减数分裂前期 I 进程的关键标识蛋白。目前,免疫荧光染色技术为减数分裂期细胞中遗传交换位点的分析与精确定位提供了新的途径,采用此技术可观察到减数分裂前期 I 中联会复合体的多种精细结构^[7-8]。为此,本研究利用免疫荧光染色技术,对 SCP3 蛋白的抗体标识联会复合体框架结构进行了观察,以期为研究小鼠初级精母细胞减数分裂前期 I 中不同亚期联会复合体形态的变化提供直接证据。

1 材料与方法

1.1 材料

从四川大学实验动物中心购买 8 周龄的 ICR/JCL 品系小鼠 2 只,体质量(28 ± 2) g,用鼠颗粒饲料喂养,常规饮水。处死小鼠后摘取睾丸置于盛有 PBS 的培养皿中,展开睾丸的曲细精管,置于盛有低渗缓冲液的玻璃皿中低渗 30 min。

1.2 制片与观察

采用铺展法制片与观察^[8]。将处理好的载玻片在甲醇染缸中浸泡、吹干后做好标记。取另一干净的载玻片平放,加 0.1 mol/L 蔗糖混合液,将经过低渗处理的曲细精管放入载玻片上的蔗糖混合液中,剪碎如悬浮状,使细胞释放,每只小鼠左右睾丸各 1 张玻片。吸取 10 μ L 悬浮液,同时用滴管将体积分数 1%的多聚甲醛溶液加在标记好的载玻片上,完全覆盖玻片,将 10 μ L 悬浮液加到玻片的一角,手动回折使之扩散覆盖全玻片。将铺展好的玻片水平放置于湿盒中室温过夜。

从湿盒中取出载玻片,平放干燥 30 min。将载玻片置于盛有体积分数 0.04% Photo-Flo (除水渍液)

的染缸中,4 min 后取出干燥 10 min。加抗体缓冲液 200 μ L/片于玻片细胞上,再放入湿盒于室温下浸润 30 min。取出载玻片,加一抗,即兔 SCP3 抗体(按 1 : 3 000 体积比稀释)40 μ L/片,小心盖上盖玻片,用橡胶糊封片后放入湿盒,37 $^{\circ}$ C 恒温过夜孵育。

然后将橡胶糊轻轻取掉,在 TBS (Tris-HCl + NaCl)缓冲液中洗 3 次,每次 10 min。加抗体缓冲液 500 μ L/片于载玻片上,然后放入水平湿盒中于 4 $^{\circ}$ C 过夜。

在 4 $^{\circ}$ C 下用 TBS 将载玻片洗 3 次,每次 10 min。在暗室中加二抗,即驴抗兔 AF555 (按 1 : 250 体积比稀释)40 μ L/片,用封口膜盖好后放入湿盒,37 $^{\circ}$ C 恒温过夜孵育 90 min。在暗室中去除封口膜后将载玻片在 TBS 中分别洗涤 10, 20 和 30 min,然后用 2 $\times$ SSC 和体积分数 0.1% NP-40 混合液冲洗玻片,再加上抗淬灭剂 20 μ L/片,盖上盖玻片并用橡胶糊封片。在荧光显微镜下用油镜观察,选取背景低、分散在一个平面、信号清晰、处于减数分裂前期 I 中的不同亚期的精母细胞进行拍摄和分析。

2 结果与分析

2.1 细线期 SCP3 蛋白的结构特征

在荧光显微镜下拍摄到的信号整合后显示红色(图 1)。图 1-A 所示的是细线期联会复合体的框架结构,此期可见短小而不连续的 SCP3 蛋白片段杂乱无序地簇聚在一起。这些短小、不连续且看似散乱的 SCP3 蛋白,即将形成连续而完整的贯穿染色体长轴的长丝状蛋白框架。

2.2 偶线期 SCP3 蛋白的结构特征

在偶线期,同源染色体开始沿染色体长轴排列,SCP3 蛋白逐渐变得明显、有序而连续。图 1-B 所示为处于偶线期早期的联会复合体的框架结构,虽然 SCP3 蛋白趋于有序而连续,并形成线状,但是还没有形成完整的联会复合体。因此,这个亚期的二价体(bivalent)或四分体(tetrad)结构并不清晰。

2.3 粗线期 SCP3 蛋白的结构特征

在粗线期,SCP3 蛋白结构完整而清晰,精确而直观地显现出复合体的框架结构(图 1-C)。因此,在此亚期可以清晰地辨别联会复合体的数目、形态和长度。小鼠精母细胞联会复合体共有 20 条,其中常染色体复合体 19 条,Y 染色体通过其 PAR (Pseudoautosomal region, 拟常染色体区段)与 X 染色体的相应区段联会形成 XY 联会复合体,图 1 C 中箭头所指即为 XY 二价体。

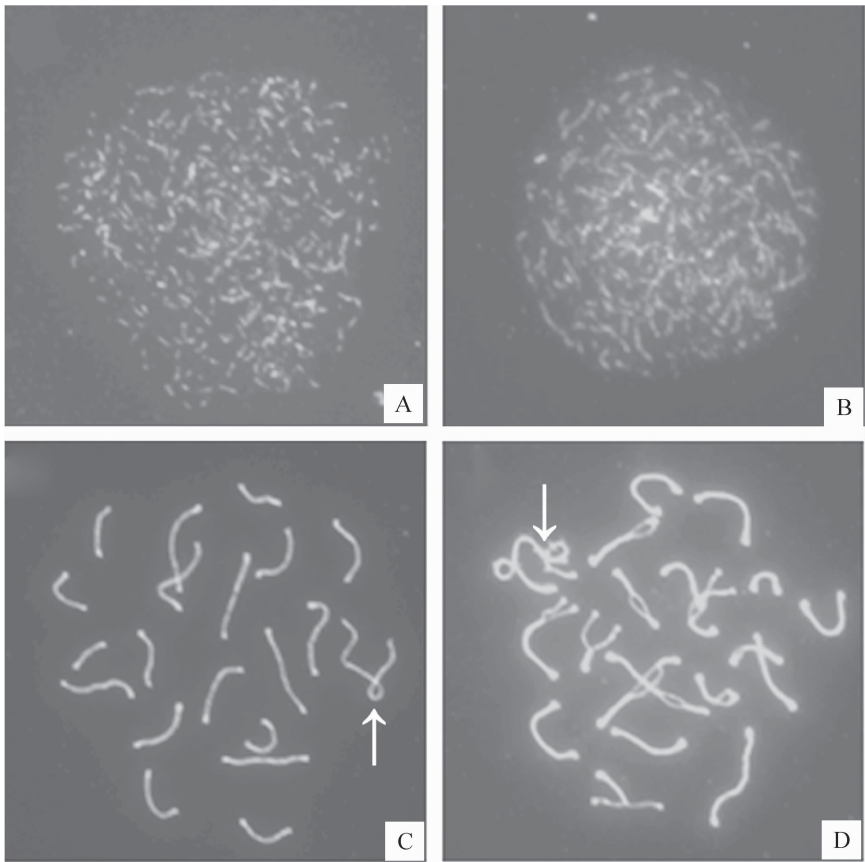


图 1 小鼠初级精母细胞减数分裂前期 I 不同亚期 SCP3 蛋白的染色观察(1 000×)

A. 细线期;B. 偶线期;C. 粗线期;D. 双线期;箭头所示为 XY 二价体

Fig. 1 Immunofluorescence staining of SCP3 protein of mouse primary spermatocytes in different sub-stages of meiotic prophase I (1 000×)

A. Leptotene;B. Zygotene;C. Pachytene;D. Diplotene;Arrow indicates XY bivalents

2. 4 双线期 SCP3 蛋白的结构特征

在双线期,染色体进一步缩短变粗,构成联会复合体的 2 条 SCP3 蛋白开始相互排斥而分离,从而导致联会复合体开始解体,但此时的二价体结构依然清晰可见(图 1-D)。所以,在双线期依然可清晰地观察到小鼠初级精母细胞中二价体的数目和形态,可知其共有二价体 20 个,包括 19 个常染色体二价体和 1 个 XY 二价体。由图 1-D 可见,部分二价体由于 2 条 SCP3 蛋白的端部排斥分离而呈“Y”状,部分二价体由于 2 条 SCP3 蛋白的中部或近中部排斥分离而在二价体内部出现“O”环。

3 讨 论

传统的联会复合体染色方法是 1977 年 Moses 等^[9-10]发明的硝酸银染色法,利用该方法可以在光学显微镜下检测到联会复合体。虽然该方法在联会复合体的结构和功能等方面的研究中得到了广泛应用,但是其染色效果存在背景差异和清晰度低、无法

准确识别联会复合体类型及不同分裂亚期的联会复合体等缺陷。与传统方法相比,联会复合体免疫荧光染色图谱具有背景差异显著、清晰度高、敏感高效和准确可靠的优势,能够准确识别联会复合体的类型及不同分裂相的行为,并可准确定位联会复合体上的遗传重组位点^[8]。

初级精母细胞在减数分裂前期 I 能否正常联会,对于精子的正常发育具有关键影响,非正常联会将会导致后续分裂延迟以及不分裂和非整倍体的产生,因此准确、有效地检测减数分裂前期 I 中不同分裂相联会复合体形态和行为的变化,对于雄性精子发生异常及其导致的雄性不育症的机理研究和临床检验均具有重要价值^[11]。本试验通过对小鼠初级精母细胞 SCP3 蛋白的免疫荧光染色,展现了减数分裂前期 I 中不同亚期(细线期、偶线期、粗线期和双线期)联会复合体框架结构的变化,其中在粗线期根据长度的变化能够精确识别不同类型的联会复合体^[12],而且通过 MLH1(MutL homologue 1,DNA

错配修复蛋白)的抗体能够鉴别联会复合体上的遗传交换位点^[7-8]。所以通过对减数分裂前期 I 中不同亚期初级精母细胞 SCP3 蛋白免疫荧光图谱的考察,能够较为准确地掌握联会复合体的行为并推测其动态变化趋势。正是由于联会复合体免疫荧光技术的这些优势,使其在揭示男性不育机理^[11,13]及影响精子发育的遗传毒理学研究等方面^[8,14-15]发挥了极其重要的作用。

相比硝酸银染色,免疫荧光染色虽然具有清晰、稳定、精确、可靠等优势,但是存在试验周期较长、试验试剂比较昂贵的不足。另外,在利用铺展法制作联会复合体的整个过程中,低渗程度的控制比较关键,不同的物种存在差异,小鼠一般掌握在 30 min 左右;在各个孵育阶段,必须注意保持玻片的水平,同时要注意温度与孵育时间的控制;最后,一抗与二抗的稀释倍数对试验结果中的荧光信号也有较大影响^[7]。

[参考文献]

[1] 张 炜,张思仲,阿周存. 联会复合体-原发无精症发病中的重要角色 [J]. 遗传,2006,28(2):231-235.
Zhang W,Zhang S Z,A Z C. Synaptonemal complex an essential role in etiology of idiopathic azoospermia [J]. Hereditas, 2006,28(2):231-235. (in Chinese)

[2] Roeder G S. Meiotic chromosomes;It takes two to tango [J]. Genes Dev,1997,11(20):2600-2621.

[3] Pelttari J, Hoja M R,Yuan L, et al. A meiotic chromosomal core consisting of cohesion complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapses in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells [J]. Mol Cell Biol, 2001,21(16):5667-5677.

[4] 屈旭光,李齐发,刘振山,等. 牦牛、犏牛睾丸组织中 SYCP3 基因 mRNA 表达水平研究 [J]. 畜牧兽医学报,2008,39(8): 1132-1136.
Qu X G,Li Q F,Liu Z S,et al. The study on the expression level of SYCP3 mRNA in yak and cattle-yak testis [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,2008,39(8):1132-1136. (in Chinese)

[5] Aarabi M,Modarressi M H,Sol Tanghoraee H,et al. Testicular expression of synaptonemal complex protein 3 (SYCP3) messenger ribonucleic acid in 110 patients with nonobstructive azoospermia [J]. Fertil Steril,2006,86(2):325-331.

[6] Miyamoto T,Hasuike S,Yogev L, et al. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3 [J]. Lancet, 2003,362(9397):1714-1719.

[7] 蔡 欣. 标记减数分裂遗传重组的免疫荧光染色方法 [J]. 中国生物化学与分子生物学报,2010,26(11):1068-1071.
Cai X. Immunofluorescent staining used for marking meiotic recombination [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology,2010,26(11):1068-1071. (in Chinese)

[8] Cai X,Li J H,Yang Q L, et al. Gamma-irradiation increased meiotic crossovers in mouse spermatocytes [J]. Mutagenesis, 2011,26(6):721-727.

[9] Moses M J. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*): I. Morphology of the autosomal complement in spread preparations [J]. Chromosoma (Berl.),1977,60:99-125.

[10] Moses M J,Slatton G,Gambling T,et al. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*): III. Quantitative evaluation [J]. Chromosoma (Berl.),1977,60:345-375.

[11] Sun F,Trpkov K,Radmaker A,et al. Variation in meiotic recombination frequencies among human males [J]. Hum Genet,2005,116(3):172-178.

[12] Lynn A,Koehler K E,Judis L,et al. Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates [J]. Science,2002,296(5576):2222-2225.

[13] Gonsalves J,Sun F,Schlegel P N,et al. Defective recombination in infertile men [J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(22): 2875-2883.

[14] Schoenmakers S,Wassenaar E,van Cappellen W A, et al. Increased frequency of asynapsis and associated meiotic silencing of heterologous chromatin in the presence of irradiation-induced extra DNA double strand breaks [J]. Dev Biol,2008, 317(1):270-281.

[15] Ahmed E A,Philippens M E,Kal H B,et al. Genetic probing of homologous recombination and non-homologous end joining during meiotic prophase in irradiated mouse spermatocytes [J]. Mutat Res,2010,688(1/2):12-18.