

# 银染技术在生殖细胞研究中的应用\*

王艺磊<sup>1,2,3)</sup> 张子平<sup>4)</sup> 李少菁<sup>2)</sup>

(集美大学水产学院养殖系<sup>1)</sup> 厦门 361021) (厦门大学海洋系<sup>2)</sup> 厦门 361005)

(昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室<sup>3)</sup> 昆明 650107) (香港城市大学生物与化学系<sup>4)</sup> 九龙 香港)

**摘 要** 新近对传统的银染技术作出改良,以氨银反应观察精子发生及受精过程中碱性蛋白的更替,以 Ag-As 反应观察精子发生过程中 NOR、嗜银细胞器、细胞骨架及其它嗜银成份的变化以及皮层反应中嗜银成分的变化。

**关键词** 银染 生殖细胞

银染技术在解剖学、组织学、细胞学等方面有着广泛的应用且历史久远。作者就曾用创立于上一世纪的神经元银染方法进行过鱼中脑细胞构筑的研究<sup>[1]</sup>。近年来,在生殖细胞的结构与功能研究方面,一些学者运用经过改进的银染技术,做出了许多颇有新意的出色工作。

## 1 氨银反应用于精子发生及受精过程碱性蛋白更替的研究

### 1.1 原 理

氨银反应(Ammoniacal Silver Reaction; ASR)是由 Black 和 Ausley 通过一系列的工作创立并证实了其工作原理及可靠性<sup>[2]</sup>。在 ASR 中,Ag<sup>+</sup>与组织细胞内的赖氨酸上的  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> 作用显黄色,与精氨酸上的胍基作用显棕黑色。组蛋白中赖氨酸与精氨酸含量很高,呈碱性。因此,ASR 对组蛋白作用的实质是与碱性蛋白中的赖氨酸和精氨酸的某些基团发生作用。鱼精蛋白较组蛋白含更多的精氨酸,碱性更强,ASR 中显示出棕褐或黑色。

### 1.2 方 法

根据 Black 和 Ausley<sup>[2]</sup>提出的方法,将材料置于固定核蛋白的固定剂固定,常规包埋、切片、脱蜡、复水,入 10% 醋酸盐缓冲的福尔马林溶液中 15 分钟做后固定,蒸馏水洗 5 次以充分洗去福尔马林。入氨银溶液(10% 硝酸银逐滴加入 25%~28% 的氨水中至刚有混浊产生为止,两者体积为 10:1)中摆染 1 分钟,蒸馏水洗 5 次,入 3% 福尔马林摆染 1~2 分

钟,水洗、脱水,透明,透蜡,封片。

电镜观察材料用 2.5% 戊二醛固定后,缓冲液冲洗过夜。双蒸水冲洗 2 次(20 分钟/次),将组织块入氨银溶液内孵育 5 分钟,双蒸水冲洗,入 3% 福尔马林溶液约 5 分钟,再入双蒸水内冲洗,常规脱水、包埋。此方法要注意的有三点:(1)实验材料尽量不要久置于固定液中。(2)组织块在反应溶液中要不断摇动,以加速反应。(3)要用双蒸水彻底洗去反应溶液。

在作者的研究中,也采用先块染后切片的方法用于光镜观察,效果良好<sup>[3]</sup>。整个反应程序与电镜的制备过程相同,但组织块一定要尽可能小(约 1mm × 1mm × 1mm)。此法也特别适用于卵径小的受精卵,如作者正在研究中的对虾受精卵。

## 1.3 应 用

### 1.3.1 研究动物受精卵原核形成过程中,核内碱性蛋白的变化或迁移。

Longo<sup>[4]</sup>首次利用 ASR 并结合光镜和电镜研究了斑点海胆(*Arbacia punctulata*)受精卵雄性原核发育期间核蛋白的改变,特别是 ASR 与父本染色质变化的关系。与雌性原核相比,未融合的精子核染色较深,而当精子进入卵子

\* 本文受到福建省自然科学基金及中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室资助;

第一作者简介:王艺磊,女,34岁,副教授,硕士;

收稿日期:1996-12-18,修回日期:1997-11-19

时精子核的染色双倍增加,表明可能存在于父本染色质的反应位点增加或从卵子细胞质来的新的反应位点增加。随着精子核的崩解产生的稀释效应,父本染色质的染色强度急剧减少。原核融合后,父本染色质出现在受精卵的一极,染色较为致密,随着时间推移,父本染色质在受精卵内渐小,染色渐弱。

我国学者陈大元<sup>[5]</sup>以仓鼠为材料,用 ASR 法研究了哺乳动物受精过程中雄性原核发育期核蛋白的变化和迁移,这一变迁与低等无脊椎动物斑点海胆的变化相似。陈也观察了雌性原核形成过程的变化,其 ASR 染色有一迅速减少的过程。在 ASR 染色中这种先增加后减少可能反映出原核发育期碱性蛋白的变化。毛铭廷,顾东旭<sup>[6]</sup>以 ASR 法也在光镜水平观察了中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans*)受精卵原核发育期碱性蛋白的转移。上述工作均表明 ASR 在研究原核发育期碱性蛋白的变化、迁移中已显示出其方便和直观性。本实验室也正在用这一方法研究过去从未有人研究过的雄核不含碱性蛋白的十足目动物精子受精过程碱性蛋白的转移。

### 1.3.2 研究精子发生过程中碱性蛋白的更替

我国细胞学家李靖炎认为<sup>[7]</sup>:一切后生动物有鞭毛的精子在其精子发生过程中存在碱性蛋白的更替。组蛋白必须要被碱性更强的蛋白所取代,而这一更替过程在有些动物出现不止一次。李<sup>[7]</sup>用细胞学的方法研究了多种动物的这一现象时,也利用了 ASR 方法,在细胞水平上从多种方法验证了这一结论。

甲壳动物的精子类型繁多,既有能运动的鞭毛型精子,亦有不运动之非鞭毛型精子。但对甲壳动物精子发生过程中核内蛋白质的变化尚缺乏研究。作者用 ASR 在光镜和电镜水平观察了虾、蟹成熟精子碱性蛋白的分布及虾、蟹精子发生过程中碱性蛋白的变化。虾、蟹这类无鞭毛的精子核内无碱性蛋白,ASR 呈阴性反应,不象有鞭毛的精子(如鱼类)的核内具有富含精氨酸的鱼精蛋白。在刀额新对虾精子发生过程中我们观察到核内碱性蛋白被抛弃从而形

成成熟精子核内无碱性蛋白的现象<sup>[3]</sup>。修正了过去认为对虾精子的顶体系由核内碱性蛋白外排堆积而成的观点。

## 2 Ag-As 反应用于精子发生过程中 NOR 变化的研究

**2.1 原理** 核仁组织者(NOR)系细胞核内含有为合成核仁结构的 DNA 模板的特殊区域。过去人们推测该部位存在有嗜银蛋白成份。当加入硝酸银时,该蛋白与  $Ag^+$  结合,加入福尔马林后, $Ag^+$  还原为银颗粒,并成为银核,促进大量的银沉积使 NOR 显黑色<sup>[8]</sup>。近年来人们已分离得到了此嗜银蛋白即 C23 核仁蛋白<sup>[9]</sup>。该蛋白为高度磷酸化蛋白,系酸性蛋白。该蛋白结合于核糖体基因位点上的组蛋白  $H_1$  结合后,诱导并维持染色质去浓缩,使核糖体基因得以大量转录。这一工作从分子水平上证实了人们过去对 Ag-As NOR 染色法工作原理的假设。

**2.2 方法** 精巢小块在  $4^{\circ}C$ 、2.5% 戊二醛溶液中固定 2 小时,缓冲液冲洗,后固定于 Carnoy's 固定液(冰醋酸:甲醇 = 1:3)5~12 分钟,在乙醇内逐级复水(每步 10 分钟),在双蒸水中洗涤 30 分钟,后将其浸入 50%~70% 的硝酸银水溶液,在 500W 灯下使其在 10~12 分钟达  $55^{\circ}C$ ,然后在双蒸水中洗涤(3 分钟/2 次),在氨银-福尔马林溶液中孵育(2g 硝酸银/2.5ml 水+2.5ml 的 33% 氨水+5ml 的 3% 福尔马林溶液,过滤)3~6 分钟在双蒸水中洗涤 3 次,每次 2 分钟,常规脱水,包埋。

**2.3 应用** 由 Goodpasture 等<sup>[8]</sup>创建的 Ag-As 银染技术,在细胞遗传学上有着广泛的运用<sup>[10]</sup>。最早将之用于精子发生的是 Schwarzacher 和 Hofgartner。他们的研究表明在哺乳动物精子发生过程中,一直到粗线期,NOR 均呈银染阳性反应,中期 I、II 的银染呈阴性,到了精细胞又呈阳性反应,说明银染强弱与 NOR 的活性之间存在着很好的相关性。Sousa<sup>[11]</sup>对人的精子发生过程中核仁及与核仁相关的结构之细胞化学进行了详尽的研究。除

了核仁外,通过银染可识别出其它三种核结构,即:致密中心(dense centers: DC)、纤维区(Fibrillar regions: FR)和致密颗粒(dense granules: DG)。在精子发生的不同时期这三种成分发生一定的变化并呈现出较为密切的联系。除哺乳动物外,Castro<sup>[12]</sup>也利用银染技术研究了甲壳动物等足目栉水虱(*Asellus aquaticus*)精子发生过程中 NOR 的活动。有趣的是:栉水虱的 NOR 在整个精子发生过程中均为银染阳性,与所有研究过的高等动物不同。同时还发现其存在着强、弱两种核仁组织者,在精母细胞中 NOR 有 3~4 个银染阳性点。这一具活性的二对染色体同时参与了 rRNA 形成。

### 3 精子细胞嗜银细胞器,细胞骨架及其他嗜银成分的银染

与前述核仁组织者基本相同的银染方法,1985 年 Azevedo<sup>[13]</sup>等最先描述了软体动物 *Nucella lapillus* 精子细胞中的阳性部位,用此法同年 Czaker<sup>[14]</sup>报道了小鼠精子发生过程中嗜银细胞器的变化,并推测这种与细胞骨架相关的蛋白均为嗜银蛋白。之后有许多文章也分别报道了银染技术可用于染配子细胞的核及细胞质中的细胞骨架结构。其中以 Sousa 在棘皮动物门和软体动物门的研究较为深入<sup>[15-19]</sup>。他研究了软体动物腹足亚纲三个科五个种类及双壳纲两个亚纲三个科八个种类的精子。并以几个重要的细胞骨架结构如:顶体囊(acrosomal vesicle; AV)顶体周边物质(periacrosomal material; PAM),中心粒凹(centriolar fossa; CF),远端中心粒卫星(proximal centriole satellite; PCS),微管外周(periphery of microtubules; MT),中心粒周边复合体(pericentriolar complex; PCC)等为线索,用银染方法确定其阳性反应部位。对棘皮动物和软体动物的研究结果发现,有些动物的细胞骨架并不被银染,如滨螺属(*Littorina*),食用鸟蛤(*Cardium edule*)和贻贝(*Mytilus edulis*)的环(annulus)与顶体周边物质(PAM);而一些通常与细胞骨架蛋白无关的区域却是银染阳性(如上述的三种软体动物的顶

体囊)。因此 Czaker<sup>[14]</sup>推测与细胞骨架相关的蛋白均为嗜银蛋白的假说是不正确的。从而也提示了嗜银结构的非同源性。

精子形态及其结构与功能的比较研究是生物系统学研究的一项重要内容。银染法可显示细胞内嗜银细胞器和细胞骨架的分布而将形态上相似的精子区别出来,如 Sousa<sup>[19]</sup>和 Wake<sup>[20]</sup>用银染分别对软体动物和两栖类的精子进行了比较分析,为比较精子学研究提供了一条新的可行途径,建立了种系发生和系统分类学的新方法。

Sousa<sup>[21]</sup>在一系列工作的基础上,还研究了人精子发生过程中后顶体鞘(postacrosomal sheath; Pas)形成和起源。Pas 在受精时精卵膜的融合中起触发作用。它由二个主要的结构即顶体后致密层(postacrosomal dense lamina; PADL)和后核带(postnuclear band; PNB)组成。在精子发生的早期,嗜银物聚集在顶体囊基部及与此区域相对的核膜的外侧和顶体腔基部附近的质膜内侧。随着精子头部后顶体区的进一步发育,与胞质膜相关的嗜银物向后生长形成顶体后致密层,同时与核膜相关的嗜银物则迁移至顶体后致密层并形成核后带。虽然有许多研究阐述了人精子细胞骨架的成分,但对 Pas 的定位却未见报道。Longo(1987)和 Paranko(1988)等分离了牛和鼠的 Pas 并发现其是一特定的  $60 \times 10^3$ u 的碱性蛋白,命名为 Calicin。Sousa 首次采用 NOR 的银染方法观察到人精子 Pas 的结构,并追踪了这一结构的形成过程,为今后分离 Pas 的组成蛋白,阐述其功能奠定了基础。

### 4 银染用于卵子皮层反应的研究

动物皮层反应中卵子的超微结构变化已有较多研究。但一般形态变化是无法确认所有皮层颗粒成分的特定命运;皮层颗粒成分与卵黄层。卵黄周边区或透明层的精确关系也难以搞清。细胞化学的研究在这一方面已显示出重要的作用。Sousa<sup>[22]</sup>及其同事运用上述 Ag-As 银染技术研究北极马氏海星 *Marthasterias*

*glacialis* 卵子的皮层反应, 观察到了一些新现象。

从一般形态看, *M. glacialis* 的皮层颗粒是在致密的基质中具有片层的结构。在受精后不久, 皮层颗粒膨大, 将其内含物排至胞外。当皮层颗粒完成其胞吐反应后, 片层成分转变为网状物, 且在基质中出现一些明亮的区域。此时片层结构与卵黄层相融合, 但基质的命运却无法追踪, 通过银染可将这一基质分为嗜银成分和非嗜银成分。这一围绕片层的基质穿透皮层颗粒形成基质芯, 而片层不被银染, 当受精和胞吐之后非嗜银成分的基质不再观察到, 同时嗜银基质和片层与卵黄膜相融合, 用蛋白酶先处理后银染, 则银染反应消失, 说明嗜银蛋白参与了皮层反应。通过银染使我们对皮层反应的细致过程有了更进一步的认识。

### 参 考 文 献

- 1 王艺磊, 张子平, 郑微云. 真鲷视顶盖的细胞构筑. 厦门大学学报(自然科学版), 1992, 31(2): 194~198
- 2 Black, M. M., H. Ansley. Histone staining with ammoniacal silver. *Science*, 1964, 143: 693~695
- 3 王艺磊, 张子平, 李少菁. 刀额新对虾精子发生过程中碱性蛋白的变化. 厦门大学学报(自然科学版), 1996, 35(6): 947~951
- 4 Longo F. J. Nucleoprotein changes during male pronuclear development as determined by the ammoniacal silver reaction. *Gamete Res.*, 1983, 4: 351~365
- 5 Chen D. Y. and F. J. Longo. A cytochemical study of nuclear changes in fertilized hamster eggs. *Anat. Record.*, 1983, 207: 325~334
- 6 毛铭廷, 顾东旭. 蟾蜍受精卵原核发育期碱性蛋白的转移. 见: "从水到陆. 刘承训教授诞辰九十周年纪念文集. 蛇蛙研究丛书. 北京: 中国林业出版社, 1990, 1: 182~185"
- 7 李靖炎. 两栖动物精子形成过程中细胞核内碱性蛋白质的更替现象. 动物学研究, 1980, 1(1): 47~58
- 8 Goodpasture, C., S. E. Bloom. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma.*, 1975, 53: 37~50
- 9 Erard, M. S., P. Belenguer, M. Caizergues-Ferrer, A. Pantaloni, F. Amalric. A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma.*, 1988, 53: 37~50
- 10 施立明. 银染色方法及其在细胞遗传学中的应用. 遗传, 1980, 1(1): 47~58
- 11 Sousa M., J. Carvalheiro. A cytochemical study of the nucleolus and nucleolus-related structures during human spermatogenesis. *Anat. Embryol.*, 1994c, 190: 479~487
- 12 Castro, M. D., G. Prantero, L. Cipriani, A. Rocchi. Silver staining analysis of nucleolar—organizer activity during spermatogenesis of *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda). *Genetica.*, 1983, 60: 163~166
- 13 Azevedo, C., F. Castilho., T. Barandela, Silver staining analysis on spermatozoa of *Nucella Lapillus* (Gastropoda, Prosobranchia). *Int. J. Invert. Reprod. Develop.*, 1985, 9: 299~307
- 14 Czaker, R. Distinct argyrophilic cytoplasmic organelles revealed during mouse spermiogenesis. A fine structure and cytochemical study. *Anat. Embryol.*, 1985, 170: 247~254
- 15 Sousa M., C. Azevedo. Comparative silver staining analysis on spermatozoa of various invertebrate species. *Int. J. Invert. Reprod. Dev.*, 1988, 13: 1~8
- 16 Sousa M., C. Azavado. Ultrastructure and AG staining of echinoderm spermatogenesis. In *Mechanism of Fertilization*, B. Dale Ed. NATO ASI Series, Vol. H45, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1990, 115~129
- 17 Sousa M., E. Oliveira. Ultrastructural and cytochemical study of spermatogenesis in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 1994a, 26: 305~311
- 18 Sousa M., E. Oliveira. An ultrastructural study of Spermatogenesis in *Helcion pellucidus* (Gastropoda, Prosobranchia). *Invert. Reprod. Dev.*, 1994b, 26(2): 119~126
- 19 Sousa M., E. Oliveira, J. Carvalheiro, V. Oliveira. Comparative silver staining of molluscan spermatozoa. *Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle.*, 1995, 166(0): 179~187
- 20 Wake, M. H. Comparative morphology of caecilian sperm (Amphibia Gymnophiona). *J. Morph.*, 1994, 221(3): 261~276
- 21 Sousa M., C. Azavado. Silver staining of the postacrosomal sheath during human spermiogenesis. *Anat. Embryol.*, 1992, 185: 271~274
- 22 Sousa M., C. Azavado. Silver staining of the cortical reaction in oocytes of *Marthasterias glacialis* (Echinodermata Asteroidea). *Can. J. Zool.*, 1987, 65: 2607~2611

## APPLICATION OF SILVER STAINING TECHNIQUE IN GERM CELLS

WANG Yi-Lei<sup>1,2,3)</sup> ZHANG Zi-Ping<sup>4)</sup> LI Shao-Jing<sup>2)</sup>*(Aquaculture Department, Fisheries College, Jimei University<sup>1)</sup>, Xiamen 361021, China)**(Oceanography Department, Xiamen University<sup>2)</sup>, Xiamen 361005, China)**(Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology,**The Chinese Academy of Sciences<sup>3)</sup>, Kunming 650107, China)**(Department of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong<sup>4)</sup>, Kowloon, Hong Kong, China)*

**ABSTRACT** We modified conventional silver staining technique by applying modified ammoniacal silver reaction. We can observe basic proteins changes during the spermatogenesis and fertilization under light and electronic microscopy. The technique has been employed to study the behavior of nucleolus organizer region of chromosome during the spermatogenesis. A modified silver nitrate technique has also been used to demonstrate argyrophilic organelle, cytoskeletal structure and argyrophilic material in germ cells. It is better to characterize the structure of cortical granules during the cortical reaction using modified silver nitrate reaction.

**KEY WORDS** Silver staining technique Germ cell