

家兔早期發生的标本制作

楊林台 周良猷 郁康华

(第二軍医大学組織胚胎学教研室)

根据高等教育部的規定，綜合性大学及师范大学生物学系、农学院畜牧兽医系及医学院学生均須學習胚胎学。对于个体早期發生的實習材料大都采用无脊椎动物(如海胆、海星等)，低等或較高等的脊椎动物(如蟾蜍、蛙及鷄等)，而高等哺乳类早期發生的實習材料，由于取材或技术上的困难，則甚为稀少*。按照理論与实际相結合的教学原則，特别是从形态学方面来看，認為缺点。因此我們参考有关文献，采取家兔的活卵作为實習材料并制作早期發生标本来解决这一問題。

选用家兔作为对象的理由是：一般在講述高等哺乳类或人胚的早期發生时多以兔、鼠、猪、猴为例，家兔取材容易，費用較廉。除夏季可有乏情期外，一年多次發情，更重要的是排卵的規律性，家兔一般約在交配后 10 小时排卵 [1][2][3]，这样就便于我們掌握并能获得所需要的不同时期发育的兔卵。

现将取卵和标本制作方法介紹如下：

(一)取卵

一、交配 雌兔为非自然性排卵，其排卵必須有性的刺激，如交配或雌兔与雌兔的互爬。交配成功的条件須視雌兔是否进入动情期，否則雌兔拒絕交配。我們是通过外陰部肉眼观察及做陰道涂片来檢查是否进入动情期。通常动情期时，外陰部充血、水肿，顏色呈深紅或紫紅，分泌物增多；涂片观察可見有大量脫落的角化鳞狀細胞，白血球很少。此外，也应注意交配时雌兔能否很好配合，如配合得宜，交配

一次即可。

二、取材 交配后按不同時間(如下表，此表根据我們所作 42 只动物的資料及其他有关文献的記載 [4][5][6])截取輸卵管。

交配后時間(小时)	卵发育时期
10—14	受精过程
15—21	1 細胞时期
22—24	2 細胞时期
24—33	4 細胞时期
33—41	8 細胞时期
44—49	16 細胞时期
50—71	桑葚期
71—75	早期胚泡
80—96	晚期胚泡(下降子宫)

取材可进行輸卵管截除术或杀死家兔。杀死家兔的方法很多，有棒击、溺斃、用麻醉剂或注射空气于心臟等。兔死亡后，剖腹并取下双侧輸卵管，如为晚期胚泡，則应連同部分子宫一并取下。將材料立即放在盛有生理鹽水或林格氏液的培养皿中，冬天最好將上述液体加温到 37°C，避免脂肪硬化后分离系膜困难。

三、冲洗法采卵 采卵的方法很多：有將輸卵管剪开或切开后放在双筒解剖显微镜下直接寻找 [7]；有的利用冲洗液將卵冲出 [4][7][8]；此种冲洗法适宜于較大的动物如家兔、狗、猪等，方法簡便，效果良好，現在詳細介紹冲洗法的具体操作过程。

先用眼科小剪刀在培养皿內將輸卵管周圍的脂肪組織除去，并將其与系膜分离。分离时切勿损伤管壁。分离系膜須完全，目的在使輸卵管全部伸直(年幼的或第一、二胎生产的家

* 协和医学院張作幹教授进行小白鼠發生的研究。

兔輸卵管很弯曲)。分离好后用生理鹽水或林格氏液洗淨,于是用吸管(口徑 0.6—0.8 毫米)套以橡皮球(30—50 毫升),吸取冲洗液。冲洗液的种类很多^{[7][8]},如生理鹽水、林格氏液、或帶有固定作用的米勒(Müller)氏液、弱福尔馬林液或弱鎳酸液等,通常采用前二者。吸滿后,插入輸卵管的喇叭口或子宮端。根据 Pincus^[8]意見,認為交配后 11—16 小时的卵,应从管的子宮端对向喇叭口冲洗,17 小时以后則应从管的喇叭口对向子宮端冲洗。但依照我們的經驗,自喇叭口插入較由子宮端容易,且对冲洗结果并无影响。因輸卵管喇叭口部分呈漏斗狀,管壁薄而潤滑。此外插入时应在液体內进行,因液体張力緣故可使輸卵管口部伸展,并能减低磨擦,避免插管穿入或刺破管壁。如插入仍感困难时,也可用尖头小鑷子夾住部分管壁向吸管頂端套入。插入后一手提起并捏住插入部分的管壁,一手挤压橡皮球。如見輸卵管膨脹,冲洗液由另一端通暢流出时,則表示冲洗成功。于是接冲洗液于薛氏(Syracuse)皿中,稍待片刻,俟卵沉入底部并向中央区域集中后放在解剖顯微鏡下寻找。如見到圓形發亮的具有結構的小体,則为發育各期的受精卵(但勿与脂肪滴相混)。于是,用吸管(口徑約为 1 毫米)在鏡下將卵吸出滴在載玻片上,即可在一般复式顯微鏡或相位顯微鏡下进行新鮮标本的观察(見圖 1, 2)。經我們試驗,置新鮮卵于冰箱內,可保存数日,卵虽稍有改变,尚

不失其一般形态。对用作观察早期發生的实验材料,很为便利。

(二) 标本制作

一、整裝

(1) 在解剖顯微鏡下將薛氏皿內的卵用吸管吸出滴于載玻片上,再用吸紙吸去多余液体。

(2) 滴加血漿^[9]或蛋白,使卵貼附。

血漿貼附制成的标本虽較清晰透明,但褪色时易在酸水中脫落。蛋白貼附則无此弊。蛋白的配制是將鷄蛋白过滤,不加甘油和防腐剂。用畢,隨即置于冰箱內。

(3) 將載玻片反扣在盛有 Carnoy 氏液的瓶口上固定,俟蛋白或血漿凝固后再放入該液內固定数分鐘。

(4) 下降到水中染色。一般用苏木紫、伊紅(Hematoxylin, Eosin)和明矾洋紅(Alum carmine)二种方法。前者褪色不易控制,后者手續既較簡便又不会过染。

(整裝制成的标本見圖 3, 4)

二、切片

(1) 嵌入組織法(根据“Lee 氏顯微鏡技术”^[7]加以改良)

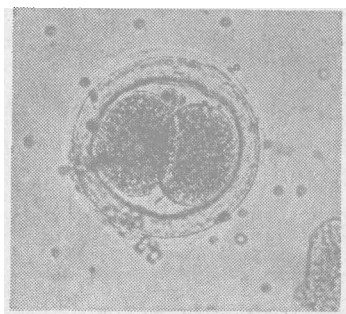


圖 1. 新鮮标本顯微照象。交配后 24 小時,二細胞期。上端在分裂球与透明帶之間有二个極体,下端在分裂球与透明帶之間可見一精子。蛋白膜較透明帶薄。140X

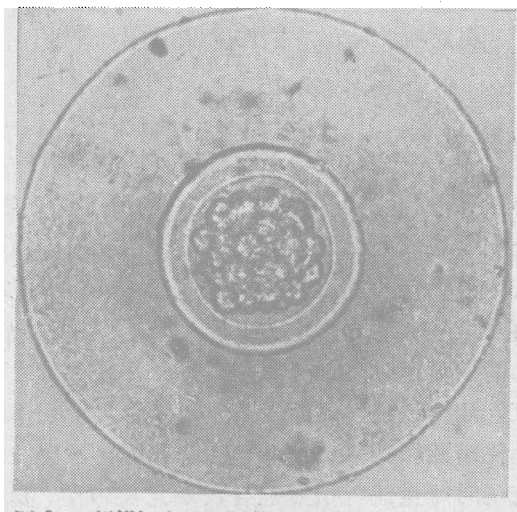


圖 2. 新鮮标本顯微照象。交配后 71 小時 2 分,桑椹期。蛋白膜增厚,約为透明帶的六倍,100X

1. 取已經固定的腦或肝組織，沖洗后切成小塊，在小塊中央用小刀挖一小洞。

2. 將新鮮或固定的卵（常用的固定液為 Bouin 氏液或 Carnoy 氏液）放在伊紅水或酒精溶液內染色，繼用吸管吸出安放到腦或肝組織的小洞中，吸去多余水分。

3. 滴加蛋白封蓋洞口。

4. 將組織塊反扣在 Carnoy 氏液上固定。

5. 俟蛋白凝固，包埋如常。

我們認為所用組織塊方面，腦比肝好，因腦組織色澤較白，安置卵時容易檢查，且腦組織在透明時不易變脆。

操作見鉗圖

1. 此法制成的標本見圖 5。

(2) 瓊脂包埋法^{[10][11]}（主要根據 Samuel 氏^[10]介紹的方法）。

瓊脂溶液的配

制：將 50c.c. 的 20—30% 的瓊脂溶液加熱并過濾之，再滴入 5% 的蟻醛數滴作防腐劑。

1. 將瓊脂溶液置于熱水浴中（約 40℃ 左右），先吸出一滴滴于載玻片上，俟其凝固，用燒熱的針頭在瓊脂中央盪一小洞。

2. 取染色的新鮮或固定卵置于小洞中，吸去多余水分。

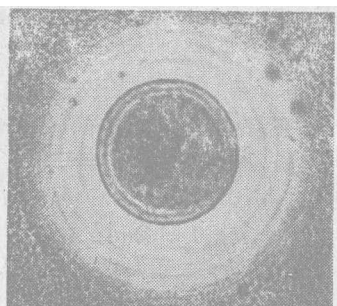


圖 3. 整裝標本顯微照象。交配后 73 小時 10 分，早期胚泡，在其一側有色淡的半月形區域——胚泡腔。明矾洋紅染色。130X

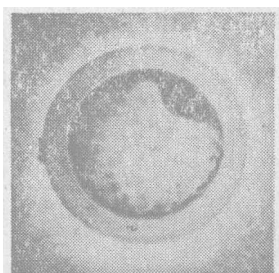
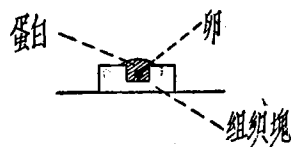


圖 4. 整裝標本顯微照象。交配后 92 小時 30 分，胚泡。胚泡腔擴大，一端色深的為內細胞羣，蛋白膜變薄，明矾洋紅染色，100X



鉗圖 1.

3. 再滴加瓊脂，將卵蓋住。

4. 用熱針在四周將先后二次滴加的瓊脂封固。

5. 用薄刀片將瓊脂塊鏟下。

6. 將此小塊按常法切片。惟在 80% 以上各級酒精脫水時須更換一次，間隔為一小時。此外，透明劑改用冬綠油 (Winter green oil) 或苯甲酸甲脂 (Methyl benzoate)。

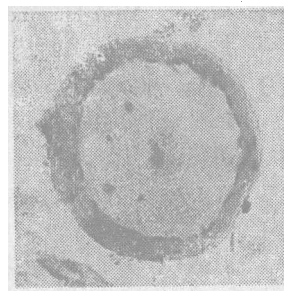


圖 5. 嵌入組織法(腦)切片顯微照象。交配后 15 小時，一細胞期。二原核在合併中。透明帶與卵之間可見很多精子，呈深色，蛋白膜較透明帶薄。8u. Fe ulgen 反應，340X

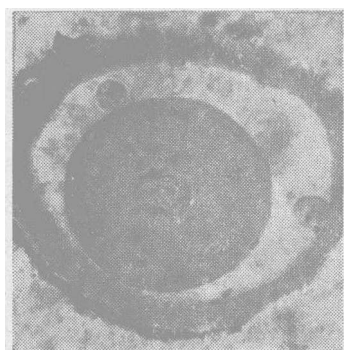


圖 6. 瓊脂包埋法切片顯微照象。交配后 16 小時 15 分，一細胞期。可見兩個極體，二原核在接近，最外深黑的一層為蛋白膜。8u. I. H. 染色，330X。

操作見鉗圖 2，此法制成的標本見圖 6。



鉗圖 2.

參考文獻

- [1] Heape, W. 1905. Ovulation and Degeneration of Ova in the Rabbit, *Proc. Roy. Soc., B*, V. 76, p. 260.
- [2] Hammond, J., & Marshall, F.H.A. 1925. Reproduction in the Rabbit. Edinburgh.

- [3] Walton, A., & Hammond, J. 1928. *Brit. J. Exp. Biol.*, V. 8, p. 190.
- [4] Gregory, P. W. 1930. Early Embryology of the Rabbit. *Carnegie Cont. to Emb.*, V. 21, p. 141.
- [5] Pincus, G., & Enzmann, E.V. 1932. Fertilization in the Rabbit. *J. Exp. Biol.*, V. 9, p. 403.
- [6] Nelson, O. E. 1953. Comparative Embryology of the Vertebrates. Constable & Co. Ltd., p. 300, London.
- [7] Lee, A. B. The Microtometist's Vade-Mecum. J. & A. Churchill, Ltd., 11th Ed., p. 475.
- [8] Pincus, G. 1930. Observation on the Living Eggs of the Rabbit. *Proc. Roy. Soc. Ser. B*, V. 107, p. 132.
- [9] Lewis, W. H., & Wright, E. S. 1935. On the Early Development of the Mouse Egg. *Carnegie Cont. to Emb.* No. 148.
- [10] McClung, C. E. 1950. Handbook of Microscopic Technique. Paul B. Hoeber, Inc. New York, 3rd. rev.
- [11] Samuel, D. M. 1944. The Use of an Agar Gel in the Sectioning of Mammalian Eggs. *J. Anat.*, V. 78, p. 173.

动物在水中游行速度

下表所列是一些淡水和海水动物游行的估计速度。这些数字刊载于1946年5月25日的“伦敦画报”(Illustrated London News); 另外有几种是蓝恩(Frank W. Lane)所辑, 曾发表于“乡人”(Countryman)杂志。关于小体积的鱼类, 蓝氏用赛马表来测定, 至于大鱼或大的海产动物则用测速仪系于捕鱼的网绳上。此项数字发表后, 虽经他人一再核对, 略有出入, 然而这些是仅有的可以获得的记录, 可以和陆上与空中动物的速率作比较(参阅本刊第二期81页, 第三期131页), 亦饶有意义。

动物名称	每小时游行英里数	动物名称	每小时游行英里数
1. 蝦	0.25	15. 黑鮪	12
2. 章鱼	4	16. 抹香鲸	20
3. 鲑	5	17. 梭鱼	20.5
4. 鳓鱼(刺背鱼)	6.8	18. 鱈	23
5. 欧洲鲤	7.3	19. 鲑	25
6. 鱈	7.5	20. 驼背鲸	25
7. 鲤	7.6	21. 青鳉	26.5
8. 鱈	8	22. 鳃鲸	30
9. 鱈	8.2	23. 飞鱼	35
10. 黄尾鳞鱼	9.3	24. 海豚	37
11. 鱈	10.2	25. 金枪鱼	44
12. 鱈	10.2	26. 大金枪鱼	50
13. 鳓	11	27. 剑鱼	60
14. 条纹鮪	12		

(演存)