

实验技术与方法

Percoll 密度梯度离心分离不同发育阶段生精细胞的方法¹⁾

吴 鑑 蒋耀青

(中国科学院遗传研究所,北京)

精子发生过程是生命周期中的重要过程,也是研究高等动物细胞分化的一个独特体系。由于精子发生这一连续过程是在睾丸组织中完成的,所以不同发育阶段的生精细胞彼此共存,而要进行有关的生化研究,必须得到均一的处于某一特定发育阶段的生精细胞。因此,如何从睾丸组织中分离出特定发育时期的生精细胞,是进行深入研究的首要条件。

精子发生过程中,由于各类细胞的浮力密度不同,因此,可以利用密度梯度离心的方法将不同密度的细胞分离开来^[7,8]。本文采用以 Percoll 为介质的不连续密度梯度离心方法,从小鼠睾丸组织中分离出均一性较好的精母细胞和精细胞。

材 料 和 方 法

(一) 取材 选用雄性性成熟昆白小鼠(由本所动物中心提供),体重 35—45 克。用断颈法处死动物,取出睾丸,置于预冷的磷酸盐蔗糖缓冲液(PBSG)中。剥离结缔组织、外层包膜及毛细血管后称重,加少量 PBSG,理出曲细精管,经二层细尼龙网过滤,去掉间质细胞,收集尼龙网上的曲细精管。

(二) 睾丸细胞悬液的制备 参考黄均蓉^[2]和 Meistrich^[9,10]的方法,作适当改进。按 1 克组织 20 毫升的比例,加入预冷的 PBSG,用剪刀或刀片将曲细精管剪成小段,在电磁搅拌器上以约 120 转/分的速度室温搅拌 10 分钟,然后加胰蛋白酶(使终浓度为 0.4%),37℃

保温 40 分钟,不时用吸管吹打细胞,使之易于分散。镜检见细胞已分散开时,加小牛血清至终浓度为 8%。冰箱内冷却 10 分钟,用二层细尼龙网过滤除去小块状物,1000 转/分离心 10 分钟,收集细胞沉淀,用 PBSG 洗两次(每次 1000 转/分,离心 10 分钟)。最后按每 1 克组织 20 毫升 PBSG 的比例加入 PBSG,同时补充 DNase I (DN-25, Sigma 公司产品)和 MgCl₂ (终浓度分别为 17 微克/毫升和 1mM),以得到分散的细胞悬液,用于密度梯度离心。

(三) Percoll 不连续密度梯度离心
参考 Meistrich 的方法^[10],并作适当改进。

Percoll (Pharmacia 公司产品)贮备液(密度 1.134 克/厘米³),用水和 1/10 体积的 10 倍浓度的 PBSG 稀释至所需浓度,并加入 MgCl₂ 和 DNase I 至终浓度分别为 1mM 和 100 微克/毫升,这就是离心时用的梯度工作液。用注射器取不同浓度的 Percoll 工作液,按密度从大到小的顺序,由管底向上一层一层地依次叠加,注意不得破坏二梯度间的界面。最后铺成 5 层界面清晰的不连续密度梯度。每个离心管共装 10 毫升梯度介质, Percoll 的浓度梯度为 30%、25%、22%、17%、15%。将 2 毫升待分离的睾丸细胞悬液(约 6×10^6 — 6×10^7 个细胞)

Wu Jian et al.: Separation of Mouse Spermatogenic Cells by Centrifugation in Percoll Density Gradients

1) 本工作曾得到黄华燧、林友刚、孙海源等同志的支持,特此致谢。

本文于 1986 年 3 月 29 日收到。

小心地铺于梯度溶液顶部,以 5000 转/分(相当于 3500g)离心 1 小时(4°C)。离心后,细胞按其自身的密度沉降在不同密度的界面上,呈白色细盘状,用针头从上到下仔细吸取各层细胞,装入离心管中,用 PBSG 洗两次(每次 1000 转/分,离心 10 分钟)。取收集得的少量细胞,用 Carnoy 液固定二次(第一次过夜)。然后用改良品红染色。显微镜下鉴定细胞类型并计数。最后将收集到的所需细胞悬浮于少量生理盐水中,置低温冰箱保存。如果待分离的细胞量大,可用多个离心管同时离心。

结果与讨论

通过上述密度梯度离心方法,可将睾丸细胞悬液分离成 5 层(图 1)。

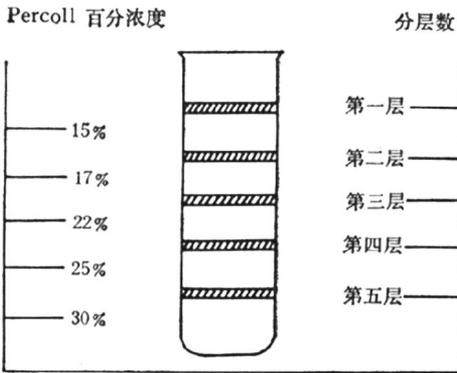


图 1 Percoll 密度梯度离心后梯度界面上形成的细胞层

从这 5 层细胞中各取出少量细胞,经固定、染色后,对照 Meistrich 的睾丸细胞图谱,在显微镜下进行细胞鉴定和分类计数。用视野中特定类型的细胞占视野总细胞的比例来表示分离效果(见表 1)。从表 1 中结果可看出,精细胞主要集中在 Percoll 浓度为 17%—20% 的界

表 1 密度梯度离心分离小鼠生精细胞的结果

所收集分层数	第三层	第五层
界面处的 Percoll 浓度	17%—20%	25%—30%
精细胞百分比	61%	—
精母细胞百分比	—	88%

表中数字为某特定类型细胞占总计数细胞的百分数。梯度离心后,第一、二、四层界面处的细胞混杂度大,未作计数。

面上,精母细胞则主要集中在 Percoll 浓度为 25%—30% 的界面上。

分离前及分离后的细胞涂片见照片(图 2)。从图 2 上可以看出,离心前细胞悬液混杂度高,含有从精原、精母至精子等各种类型的细胞。但密度梯度离心后,第三及第五层的细胞纯度大为提高,其中第三层的精细胞占视野总细胞的 61%,而第五层的精母细胞更达到了总细胞的 88%。这样的纯度足以用于对精子发生过程中某一特定细胞类型进行生化分析用。但梯度离心后,第一、二和四层界面处所回收的

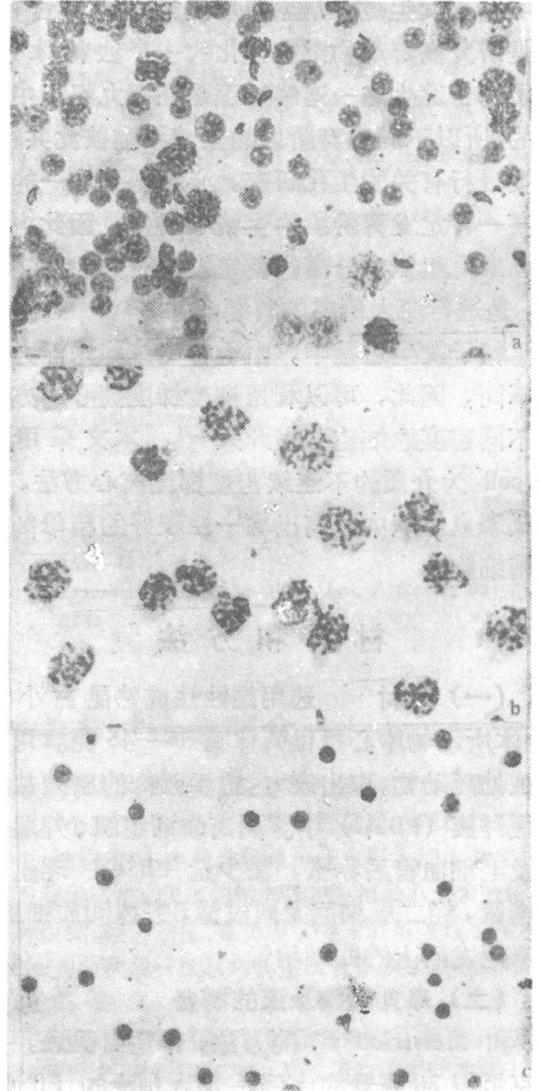


图 2 小鼠生精细胞在密度梯度离心分离前后的细胞图谱(改良品红染色)

a. 分离前的细胞悬液; b. 分离后的精母细胞; c. 分离后的精细胞。

细胞其混杂度仍较大,尚难以直接用来作进一步的分析。

生精细胞是一种连续发生过程中的细胞,一般的方法难于达到分离的目的。密度梯度离心是分离纯化特定发育时期生精细胞的有效工具^[6,8]。但是,蔗糖、血清白蛋白(BSA)、聚蔗糖(Ficoll)及 Renografin 等过去常用的介质,存在的缺点较多,我们则选用了七十年代以来筛选出来的 Percoll (一种硅胶包裹的聚乙烯吡咯烷酮)作介质。它具有渗透压低、不穿透细胞、粘度小、密度高、对细胞无毒害、易于从生物样品中除去等优点^[11,12],因而被广泛地用于各种动植物细胞的分离^[1,8,12,15]。在我们的分离实验中,我们得到了纯度较高的特定细胞。台盼蓝染色鉴定时,细胞的存活率都高达95%以上,这些也都说明选择 Percoll 作为分离介质的优越性。

纯化啮齿类雄性生殖细胞的方法,有沉降法、淘洗法等等。只用一种方法时,分离纯度一般仅为75—85%^[3,4,9,10]。而国际上将 Percoll 用来分离生精细胞,都是将密度梯度离心与其它方法结合起来使用的^[5,10,13,14]。虽分离纯度提高了,但分离过程较繁琐,而且需要特殊仪器^[4,5]。我们根据国内的实验条件,设计并摸索出一个只用 Percoll 密度梯度离心,且在一般冷冻离心机上就能进行的分离方法(只需要5000转/分)。用这一方法能得到相当纯度的精母细胞(88%)和精细胞(61%),既比一般的自然沉降节省时间,又不需要特殊的仪器,这对不同发育阶段生精细胞的生化分析和研究都是很有利的。

梯度离心的前提是要制得分散程度好的睾丸细胞悬浮液。目前的常用方法有:机械法、

机械加酶法、胰酶法、胰酶加 EDTA 法等^[7,9]。机械法对细胞损伤较严重;胰酶法分散效果不如胰酶加 EDTA 法。我们则采用先是短时间、较温和的机械分散(磁力搅拌),后用胰酶加 EDTA 进一步分散的方法。在最后得到的分散的细胞悬液和密度梯度离心的介质中加少量 DNase I 以防止游离 DNA 所产生的细胞聚集。这样就能得到分散度很好的细胞悬液。

我们摸索建立的这一简便易行的密度梯度离心法,为研究精子发生过程提供了一种有效的手段。

参 考 文 献

- [1] 黄大年等: 1983. 遗传, 5(2): 10—12.
- [2] 黄均蓉、李征明: 1982. 生殖与避孕, 2(2): 17—22.
- [3] Beckman, J. K. et al.: 1978. *Biochim. Biophys. Acta*, 530: 360—364.
- [4] Gold, B. et al.: 1983. *J. Exp. Zool.*, 225: 123—134.
- [5] Grabske, R. J. et al.: 1975. *J. Cell Physiol.*, 86: 177—190.
- [6] Loir, M. and M. Lanneau: 1975. *Exp. Cell Res.*, 92: 499—505.
- [7] Meistrich, M. L.: 1972. *J. Cell Physiol.*, 80: 299—312.
- [8] Meistrich, M. L. and P. K. Trostle: 1975. *Exp. Cell Res.*, 92: 231—244.
- [9] Meistrich, M. L. et al.: 1977. In: *Methods in Cell Biology* (Ed. by D. M. Prescott), Vol. 15, pp. 15—52.
- [10] Meistrich, M. L. et al.: 1981. *Biol. Reprod.*, 25: 1065—1077.
- [11] Pertoft, H. and T. C. Laurent: 1969. *Prog. Sep. Puri.*, 2: 71—90.
- [12] Pertoft, H. and T. C. Laurent: 1979. In: *Separation of Cells and Subcellular Elements* (Ed. by H. Peeters), Pergamon Press, pp. 67—72.
- [13] Stern, L.: 1983. *Exp. Cell Res.*, 143: 247—255.
- [14] Stern, L. et al.: 1983. *Biol. Reprod.*, 28: 483—496.
- [15] Ulmer, A. J.: 1979. *J. Immunol. Methods.*, 30: 1—10.