

林麝染色体制备方法及其核型与 G-带带型研究

邹方东¹ 岳碧松¹ 张义正^{1*} 陈三²

(1 四川大学生命科学学院, 成都, 610064) (2 四川养麝研究所, 都江堰, 611830)

摘要: 以林麝外周血淋巴细胞为实验材料, 在培养基中加入植物血球凝集素 PHA 和伴刀豆球蛋白 ConA, 由此建立了适合其增殖的培养体系。培养 75 h 后, 用空气干燥法制备染色体, 确定林麝核型是 $2N = 58$, 且全都是端着丝粒染色体。实验结果还表明, 通过获得较晚的中期分裂相, 可以确定染色体是端着丝粒不是亚端着丝粒类型。同时首次应用染色体 G-带技术, 研究了林麝染色体的 G-带带型。

关键词: 林麝; 核型; 端着丝粒染色体; G-带

中图分类号: Q958.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050(2004)02-0115-06

Studies on the Karyotype and Chromosomal G Banding of Musk Deer (*Moschus berezovskii*) with a New Method

ZOU Fangdong¹ YUE Bisong¹ ZHANG Yizheng^{1*} CHEN San¹

(1 College of Life Science, Sichuan University, Chengdu, 610064)

(2 Institute of Sichuan Musk Deer Breeding, Dujiangyan, 611830)

Abstract: A unique culture system has been developed to induce more peripheral blood lymphocytes of musk deer (*Moschus berezovskii*) into cell cycle by adding an equal quantity of phytohemagglutinin (PHA) and concanavalin A (ConA), which stimulate G₀ phase lymphocytes to proliferate. Peripheral blood samples from 5 musk deers (3 ♂, 2 ♀) of Institute of Sichuan Musk Deer Breeding was obtained from ear vein with heparin as an anticoagulant, and inoculated 0.3 - 0.4 ml of blood into 54 ml of RPMI 1640 medium containing 1 ml of bovine serum, 40 μg of PHA and ConA, 0.05 ml of heparin (10 mg/ml) and an appropriate antibiotics. The pH value of medium was adjusted to 7.0 - 7.2. The blood was cultured for 75 hrs and added colchicine to a final concentration of 0.01 μg/ml before the end of culturing. Preparation of chromosome was carried out with air dry method and displayed Gbands with 0.025% trypsin. It was found that the karyotype of *M. berezovskii* was $2N = 58$, and all of the chromosomes are telocentric ones. The results indicated that using late metaphases, in which all the chromosomes are linked only by centromeres, can determine whether the chromosome is telocentric or not. This study was the first time to use Gbanding technique to analyze the chromosomes of *M. moschiferus*.

Key words: Musk deer (*Moschus moschiferus*); Karyotype; Telocentric chromosomes; Gbanding

麝科动物是小型偶蹄类, 全球共有 1 属 5 种, 包括林麝 (*Moschus berezovskii*)、原麝 (*M. moschiferus*)、马麝 (*M. chrysogaster*)、黑麝 (*M. fuscus*) 和喜马拉雅麝 (*M. leucogaster*), 主要分布在亚洲东部, 这 5 种麝在中国均有分布^[1]。由于麝能分泌极为名贵的麝香而惨遭偷猎者的无情捕杀, 数量急剧减少, 因此 2002 年被我国列为 I 级保护动物。目前国内外学者对麝的形态学和生理学, 特

别是对麝香的分泌机理、麝香的理化性质、人工合成等方面做了大量工作。而在微观方面, 仅有极少数报道, 如研究其随机扩增多态 DNA^[2], 细胞色素 b 基因的测序等^[3]。关于麝的核型或带型研究, 仅见对林麝的核型做过初步研究^[4-5], 认为林麝染色体属于末端或亚端着丝粒类型。我们通过优化细胞培养条件, 发现林麝染色体并没有亚端着丝粒类型, 而全都是端着丝粒染色体。同时, 为了使端着丝粒染

基金项目: 科技部重大基础前期研究专项基金资助项目 (2003CCA03000)

作者简介: 邹方东 (1970-), 男, 硕士, 副教授, 主要从事濒危动物的细胞及分子生物学研究. E-mail: fundzou@scu.edu.cn

收稿日期: 2003-03-10; 修回日期: 2003-08-04

*通讯作者, E-mail: yizhang@scu.edu.cn

染色体的核型配对更加准确, 我们进一步研究了林麝的 G- 带带型, 为麝科种间染色体同源性分析和麝的细胞遗传学研究以及珍稀动物保护提供更为详实的基础资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

林麝 5 只 (3 公、2 母), 来自四川养麝研究所 (都江堰市)。

1.2 外周血淋巴细胞的培养及染色体的制备

从林麝耳静脉取外周血 0.3 ~ 0.4 ml, 接种在 5 ml 综合培养基 [培养基组成: RPMI 1640 4 ml、小牛血清 1 ml、植物血球凝集素 (Phytohemagglutinin, PHA) 和伴刀豆球蛋白 (Concanavalin A, ConA) 各 40 μ g、肝素钠 (10 mg/ml) 0.05 ml、青霉素和链霉素适量, pH 7.0 ~ 7.2], 38 $^{\circ}$ C 培养 65 h, 在培养

终止前 10 h 加入秋水仙素至终浓度 0.01 μ g/ml。继续培养 10 h 后, 离心收集细胞, 常规空气干燥法制备染色体^[6]。

1.3 G- 带的显示

空气干燥法制备的染色体在 37 $^{\circ}$ C 温箱内预处理 3 h, 用 0.025% 胰蛋白酶溶液处理 45 s, GKN 液漂洗 30 s, 10% Gemas 磷酸缓冲液染色 10 min, 自来水细流冲洗, 空气干燥、镜检^[6]。

2 结果

2.1 核型

共统计分析 45 个分散很好的中期分裂相, 染色体数目都为 58 条, 测定染色体相对长度, 结果如表 1。染色体相对长度等于该条染色体长度除以单倍染色体总长度, 再乘以 100%, 用百分率表示。林麝核型是 $2N = 58$, 如图 1 所示。

表 1 林麝染色体相对长度

Table 1 The relative length of chromosomes in *Moschus berezovskii*

染色体数 No. of Chromosome	相对长度 Relative length	着丝粒 Centromere	染色体数 No. of Chromosome	相对长度 Relative length	着丝粒 Centromere
1	5.09 \pm 0.07	t	16	3.16 \pm 0.17	t
2	4.65 \pm 0.23	t	17	3.11 \pm 0.18	t
3	4.54 \pm 0.04	t	18	2.95 \pm 0.18	t
4	4.50 \pm 0.01	t	19	2.93 \pm 0.02	t
5	4.46 \pm 0.09	t	20	2.88 \pm 0.01	t
6	4.35 \pm 0.09	t	21	2.76 \pm 0.04	t
7	4.29 \pm 0.03	t	22	2.75 \pm 0.03	t
8	4.25 \pm 0.01	t	23	2.66 \pm 0.01	t
9	4.09 \pm 0.01	t	24	2.57 \pm 0.01	t
10	3.87 \pm 0.06	t	25	2.56 \pm 0.01	t
11	3.74 \pm 0.02	t	26	2.42 \pm 0.01	t
12	3.63 \pm 0.03	t	27	2.39 \pm 0.03	t
13	3.57 \pm 0.47	t	28	2.20 \pm 0.02	t
14	3.42 \pm 0.01	t	X	5.17 \pm 0.13	t
15	3.21 \pm 0.29	t	Y	2.10 \pm 0.01	t

t: 表示端着丝粒染色体 Telocentric chromosome

从表 1 和图 1 可见, 林麝染色体大小变化呈连续递减。通过染色体长度测量可以确定雄性林麝分裂相中存在一条最长的染色体和一条最短的染色体

不能配对, 其余的 56 条染色体都能够两两配对, 因此, 最长的一条染色体是 X 染色体, 最短的一条染色体是 Y 染色体。

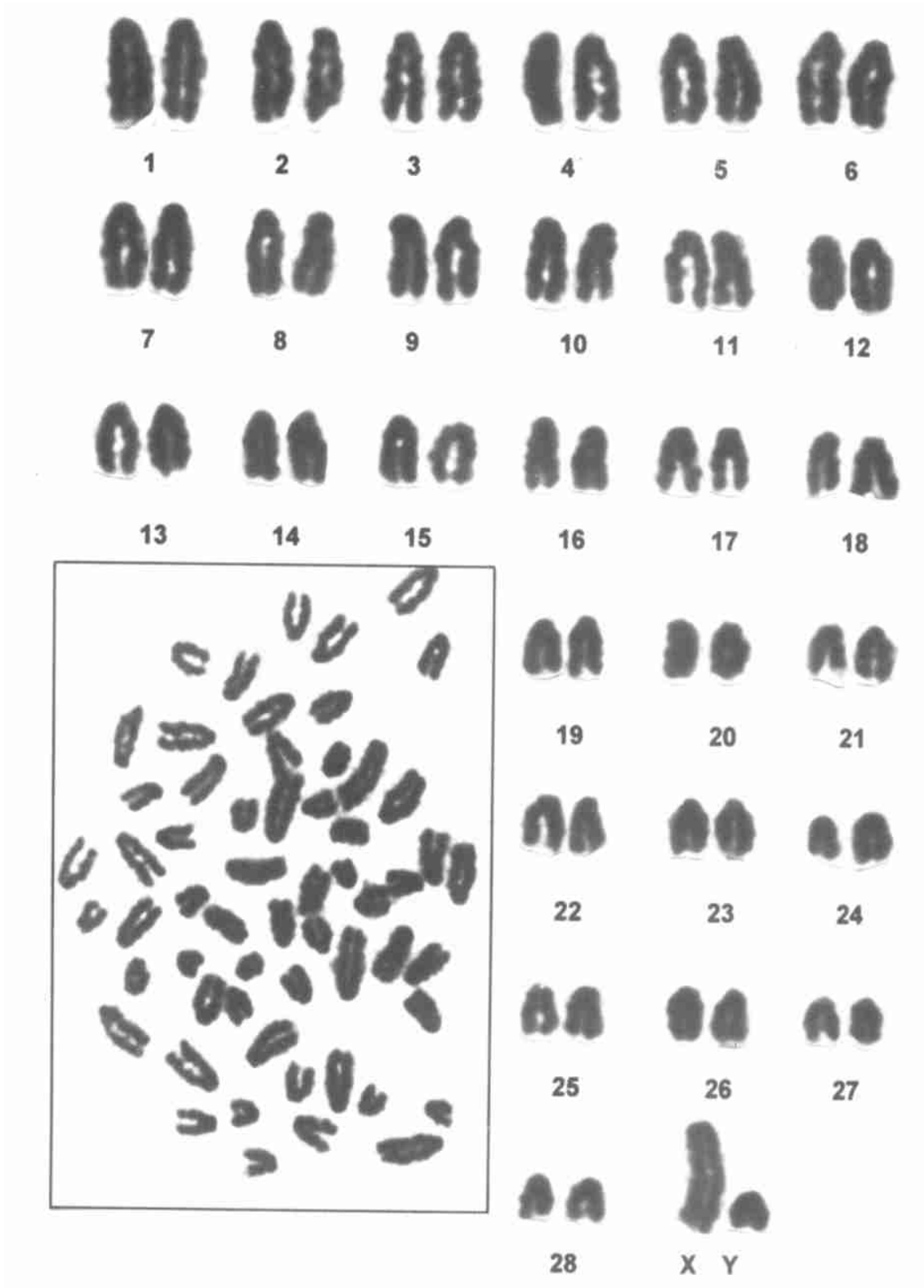


图 1 林麝核型， $2n = 58$ ，框图表示中期分裂相

Fig. 1 The karyotype of Musk deer (*Moschus moschiferus*), $2n = 58$, panel shows its metaphase

2.2 林麝染色体类型

图2所示的染色体在末端连接在一起，看不出明显的短臂，所以，根据Levan^[7]的划分标准，林麝染色体均为端着丝粒染色体。

2.3 林麝染色体 G-带带型

通过空气干燥法制备的染色体用0.025%的胰蛋白酶处理45s，能够得到比较好的G-带带型，结果如图3所示。根据G-带结果，可以把林麝58条染色体比较准确地进行配对。由于林麝所有染色体着丝粒位置都是在端部，而且染色体大小呈现连续的递减变化，因此，根据G-带带型进行染色体配对结果将更为可靠。

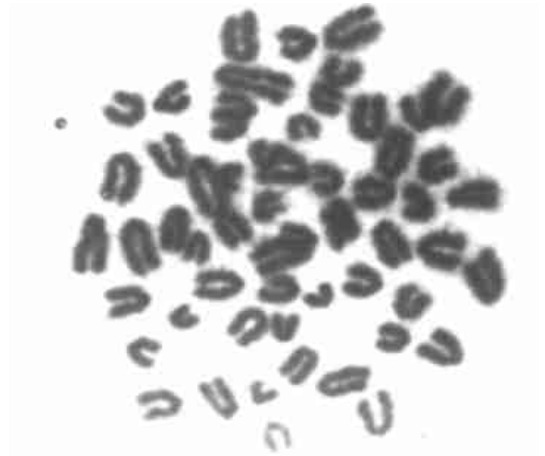


图2 林麝端着丝粒染色体

Fig.2 Telocentric chromosomes of musk deer (*Moschus berezovskii*)

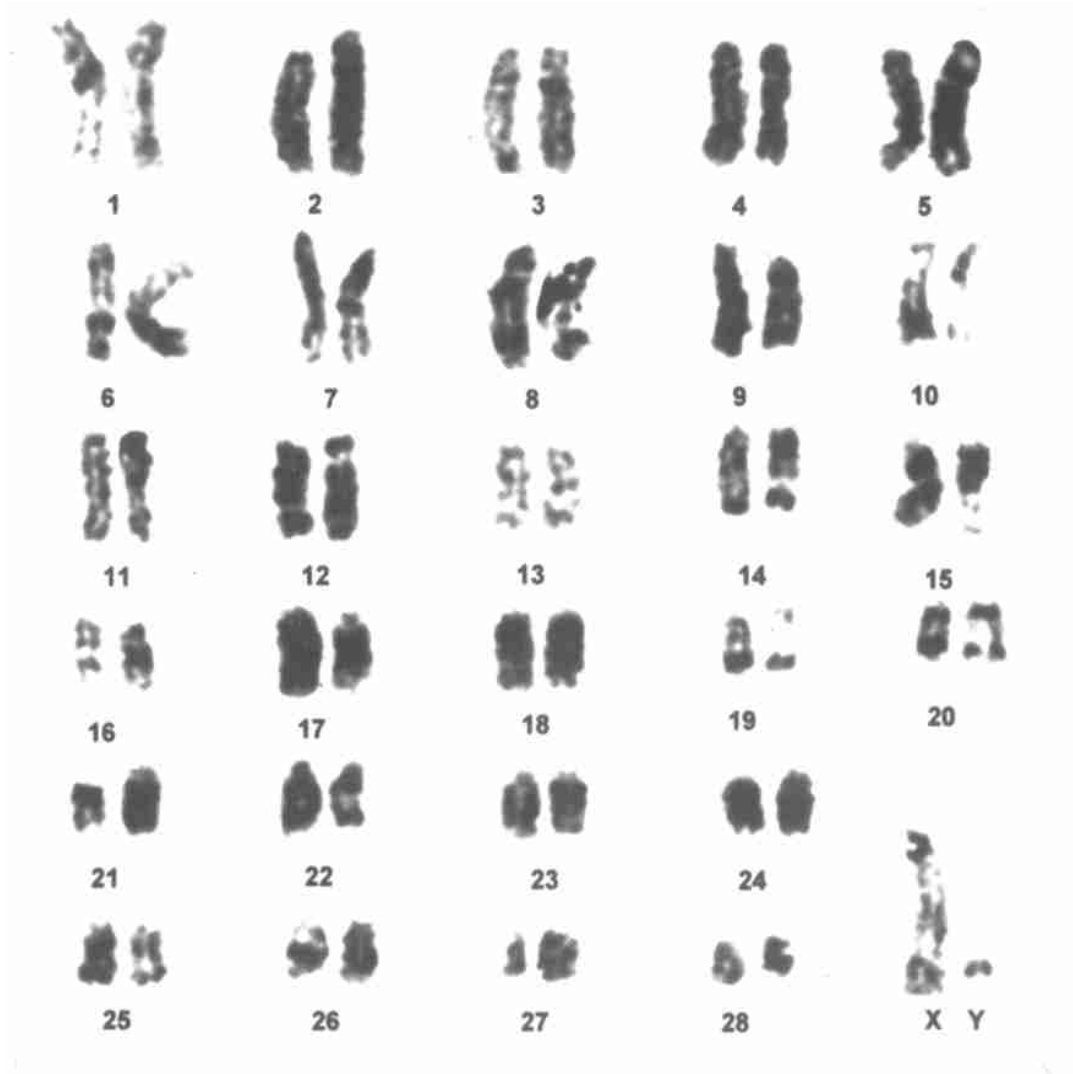


图3 林麝染色体 G带带型

Fig.3 Chromosomal Gbanding of musk deer (*Moschus berezovskii*)

3 讨论

3.1 关于林麝外周血淋巴细胞培养及染色体制备

为了制备染色体，哺乳动物外周血淋巴细胞的培养常常需要在培养基中加入植物血球凝集素 (PHA)，以刺激淋巴细胞从 G₀ 期进入细胞周期，进行 DNA 复制。除使用 PHA 外，还可以在培养基中加入伴刀豆球蛋白 (ConA)，也可以起到类似促进淋巴细胞增殖的目的。由于林麝外周血液中红细胞的含量比一般哺乳动物要丰富得多，按照常规的培养方法，要想获得比较多的分裂相比较困难，因此，我们在培养外周血细胞时，一方面同时在培养基中加入等量的 PHA 和 ConA，另一方面降低秋水仙素浓度，从传统的不低于 0.02 μg/ml 降低到 0.01 μg/ml，并将其对细胞的作用时间延长到 10 h，从而有更多的细胞进入细胞周期，中期分裂相也就相应地增多了。对于哺乳动物，决定染色体制作成功的关键步骤是外周血培养。在培养基中同时加入 PHA 和 ConA 能诱导更多的淋巴细胞进入细胞周期。这不但意味着能够获得大量的中期分裂相，为后续染色体核型分析、带型研究打下基础，更意味着减少了对珍稀濒危动物的损伤，提高实验成功率。对珍稀濒危动物，特别是哺乳动物取血进行细胞培养的实验越来越艰难，不但所取血液量少，而且很难进行第二次取样。所以，提高血培养成功率就显得非常关键。本实验摸索的血培养方法，在很大程度上提高了实验成功率，减少了对动物的损伤和避免了重复取样。这种同时用 PHA 和 ConA 来诱导更多淋巴细胞增殖的方法简单可行。

3.2 关于林麝染色体着丝粒类型

根据着丝粒指数 (染色体短臂长度除以染色体全长，乘以 100%)，按 Levan^[7] 的标准划分，将染色体划分为中着丝粒 (m)、亚中着丝粒 (sm)、亚端着丝粒 (st) 及端着丝粒 (t) 4 类。着丝粒的主要功能是将姐妹染色单体连接在一起，保证有丝分裂过程中遗传物质正确地分配给子细胞。研究表明，姐妹染色单体通过粘连蛋白 (Cohesin) 连接在一起，随着细胞进入有丝分裂中期，染色体臂上的粘连蛋白被降解，染色体臂分开，只在着丝粒部位还有粘连蛋白存在，将染色单体连接在一起^[8,9]。因此，根据最后分开的部位就是着丝粒这一事实，结合我们的实验结果，如图 2 所示的所有染色体只

在末端连接在一起，我们可以肯定，林麝染色体全是端着丝粒染色体。

早前研究表明，林麝染色体是端着丝粒染色体或者是亚端着丝粒染色体^[4,5]。由于林麝染色体长度呈连续递减的特征，相邻大小的染色体长度差异不明显，所以，这些研究也没有确定哪些染色体是端着丝粒类型，哪些是亚端着丝粒类型。分析其原因可能是所获得的分裂相并未真正进入有丝分裂中期较晚时间段，还有少数染色体臂并未分开，而将端着丝粒染色体认为是亚端着丝粒染色体。所以用晚中期分裂相来判断染色体是端着丝粒还是亚端着丝粒类型，是一个非常简单而又实用的原则。

我们没有通过传统的显示染色体 C-带来确定着丝粒位置和类型，除了实验操作费时之外，还由于 C-带的出现部位不仅仅局限于着丝粒，往往在端粒和其它部位也会显示出来^[10]。因而，我们认为，只要能够获得较晚的中期分裂相，对于确定是端着丝粒还是亚端着丝粒染色体将是一个非常简单而又实用的原则。

3.3 关于染色体 G-带带型

林麝染色体 G-带带型研究具有意义。由于林麝所有染色体都是端着丝粒类型，而且染色体大小呈现连续递减变化，因此，通过常规方法进行染色体的核型配对，就存在一定的误差。但是根据 G-带带型进行染色体配对，结果就更为可靠。本实验首次比较准确地确定了林麝核型，证实最长的一条染色体是 X 染色体，最短的一条染色体是 Y 染色体。

参考文献：

- [1] 盛和林，大泰司纪之，陆厚基. 中国野生哺乳动物 [M]. 北京：中国林业出版社，1999. 168 - 173.
- [2] 包惠芳，徐宏发，陆厚基. 林麝和马麝随机扩增多态 DNA 的研究 [J]. 兽类学报，1999，19 (4)：241 - 247.
- [3] 宿兵，王应祥，王岐山. 安徽麝线粒体 DNA 细胞色素 b 基因全长序列分析 [J]. 动物学研究，2001，22 (3)：169 - 173.
- [4] Shi L M, Ma K. The mitotic and synaptonemal karyotypes of the musk deer, *Moschus moschiferus* [J]. *Mammalian Chromosomes Newsletter*, 1986, (2)：103 - 108.
- [5] 郭键民，王建华，范晖，邓凤鸣，张治国. 林麝核型研究初报 [J]. 兽类学报，1988，8 (1)：73 - 75.
- [6] 陈文元，王子淑，王喜忠. 中国家猪染色体 [M]. 成都：四川大学出版社，1993. 75 - 76.
- [7] Levan A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J].

- Hereditas*, 1964, 52: 21 - 220.
- [8] Nasmyth K, Peters J M, Uhlmann F. Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids [J]. *Science*, 2000, **288**: 1 379 - 1 384.
- [9] Waizenegger I C, Haut S, Meinke A, Peters J M. Two distinct pathways remove mammalian cohesin complexes from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase [J]. *Cell*, 2000, **103**: 399 - 410.
- [10] 王亚军, 王喜忠, 王子淑, 陈红卫, 何光昕, 费立松, 宋云芳, 扬云, 余刚. 小熊猫染色体异染色质的显示 [J]. *动物学报*, 1999, **45** (3): 339 - 344.