

仙居鸡染色体 G 带和 Ag-NORs 的研究

陈国宏¹, 李碧春¹, 徐琪¹, 张学余², 吴信生¹, 刘莉¹, 嵇宝华¹

(1. 扬州大学畜牧兽医学院动科系, 扬州 225009; 2. 中国农业科学院家禽研究所, 扬州 225003)

摘要: 运用改进的鸡外周血淋巴细胞培养——空气干燥法, 分析了仙居鸡染色体 G 带和 Ag-NORs。G 带研究结果表明: 前 10 对大型染色体可分为 30 个区, 144 条带, 同时对 G 带带型特征进行了具体描述, 并绘制了 G 带模式图。Ag-NORs 处理发现: 仙居鸡的 Ag-NORs 常分布于 1p 3p 4p 2p 2q 上, 均数为 3.26, 众数为 3。不同个体间以及同一个体的不同细胞间 Ag-NORs 数目存在多态性; 此外研究还发现 Ag-NORs 联合现象。

关键词: 鸡; 染色体; G 带; Ag-NORs

中图分类号: S831.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0366-6964(2004)02-0141-05

仙居鸡又名梅林鸡等, 是我国特有古老地方鸡种, 原产于浙江省仙居县, 该品种历经百余年的选育, 已形成稳定的遗传特征, 是我国优良的小型鸡种资源之一。随着基因组图谱分析的需要, 进行地方鸡种细胞遗传学研究显得十分重要。程光潮等^[1]、傅金恋^[2]、郑喜邦等^[3]、刘友清等^[4]、张廷钦等^[5]、刘莉^[6]、Shin O^[7, 8]等先后开展了研究, 从细胞遗传学角度揭示了部分鸡种的种质特性。

本研究以仙居鸡保种群为研究素材, 进行 G 带 Ag-NORs 分析, 并绘制简明的仙居鸡核型、G 带模式图, 旨在了解该品种的种质特性, 为该品种的保存、种质评定及经济性状的改良与利用寻找新的途径, 并为我国地方鸡种的研究积累有价值的细胞遗传学资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以中国农业科学院家禽研究所仙居鸡的保种群为研究素材, 在 100 羽试验鸡中随机抽取 10 羽公鸡, 18 羽母鸡作为研究材料。

1.2 试验方法

1.2.1 染色体标本片的制备 采用改进的外周血淋巴细胞培养——空气干燥法制备染色体标本片。将 RPMI 1640 培养液和新生牛血清以 4:1 比例混合, 滴加适量

PHA 稀释液、硫酸庆大—卡诺霉素和肝素钠, 混匀后分装于培养瓶(5 mL/瓶); 用经肝素润湿的无菌注射器翅静脉采血, 注入无菌离心管中, 500 r/min 离心 5 min, 吸取上层淋巴细胞层, 注入培养基内, 静置于 39℃恒温培养箱中培养 68~72 h; 终止培养; 新配制的固定液固定, 滴片, 空气干燥; Giemsa 染液染色, 镜检。

1.2.2 G 带标本片的制备及分析 将一定片龄的染色体标本片放入 60℃烤箱中烤 12 h, 放入 38℃的恒温箱中 1~3 d, 胰酶处理前取出标本让其降至室温。取烤片标本浸没于消化液中, 消化处理, 用 Giemsa 染色液染色, 镜检, 选择好的分裂相显微摄影。每只鸡选约 30 个较好前中期染色体分裂相, 在显微镜下观察, 确定染色体带的数量、相对位置、颜色深浅及宽窄等, 计数每个细胞前 10 对染色体带纹的数目, 公鸡母鸡各选一张较好的照片, 作成 G-带带型图, 并参照有关家鸡^[2]G-带模式图进行区带的划分, 绘制仙居鸡 G-带模式图。

1.2.3 Ag-NORs 标本片的制备及分析 烤片置水浴锅, 标本细胞面朝上平放其上, 加 50% AgNO₃ 溶液和明胶显影液, 覆以吸水纸, 直到玻片呈金褐色为止, 并用蒸馏水快速漂洗, 晾干, 观察, 复染, 摄影。在显微镜下选择每个个体的约 50 个良好的 Ag-NORs 分裂相, 计数每个细胞 Ag-NORs 数目, 并观察其分布规律。

2 结果与分析

2.1 G 带带型分析及其区带划分、编号及命名

仙居鸡的观察 G 带细胞达 50 个以上, 前 10 对大型染色体 G 带, 见图 1。根据染色体的共同特征和相对长度绘制仙居鸡染色体 G 带模式图, 见图 2。

收稿日期: 2002-09-23

基金项目: 国家高新技术发展计划项目(863-2001AA243082); 国家自然科学基金资助项目(30170673)

作者简介: 陈国宏(1963-), 男, 江苏扬州人, 教授、博士生导师, 主要从事动物遗传资源评价、保护与利用的研究。E-mail: ghchen@mail.yzu.edu.cn

共分为 30 个区, 144 带, 前 10 对(包括 Z 染色体)和 W 染色体的 G 带带型特征描述如下, 见表 1。



图 1 仙居鸡前 10 对染色体 G 带(♀)

Fig. 1 Xianju chickens' G-band of the first ten chromosomes

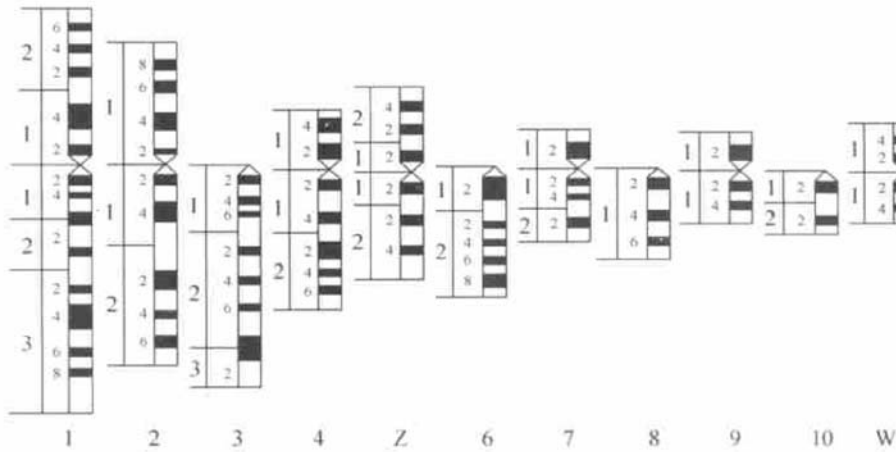


图 2 仙居鸡染色体 G 带模式图(♀)

Fig. 2 G-band ideogram of Xianju chickens' chromosome

表 1 仙居鸡染色体 G 带带型特征

Table 1 Characteristic of Xianju chickens' G-band

染色体号 NO.	臂 Arm	条 Band	区数 Region	界标位置 Position of landmark	典型特征 Characteristic
1	p	11	2	中部阴性带(2-1)	1-4 带为一条宽带, 但染色体较浅末端均匀分布 3 条带
	q	17	3	近侧深带(2-1), 近中部阴性带(3-1)	
2	p	9	1	近中部阴性带(2-1)	带 1-2 与 1-4 有时融合成一条带, 末端的负染区较大
	q	11	2		1-2 带很窄
3	q	15	3	近侧的阴性带(2-1), 远侧的深带(3-1)	末端为一条深染带, 带 1-2 较窄
					带 1-4 与 1-6 有时融合成一条深带, 2 区均匀分布 3 条带, 带 3-1 染色较深
4	p	5	1	中部阴性带(2-1)	带 1-2 染色较深
	q	11	2		末端两条带较一致
Z	p	7	2	近侧阴性带(2-1)	整条带呈对称分布, 且条带的宽度、染色深浅也较一致
	q	7	2	近侧阴性带(2-1)	
6	q	11	2	近侧阴性带(2-1)	带 1-2 较宽, 中部均匀分布 3 条带, 末端为 1 条深带
					带 1-2 较宽
7	p	3	1	中部阴性带(2-1)	带 1-2 较宽
	q	7	2		带 1-2 与带 1-4 有时融合成一条深带
8	q	7	1		均匀分布 3 条带
					带 1-2 较宽
9	p	3	1		带 1-2 较宽
	q	5	1		2 条带大小较一致
10	q	5	2	中部阴性带(2-1)	2 条深带宽度较一致
					整条带呈对称分布, 且条带的宽度染色深浅也较一致
w	p	5	1		整条带呈对称分布, 且条带的宽度染色深浅也较一致
	q	5	1		

2.2 仙居鸡 Ag-NORs 分析

银染显示, 仙居鸡 Ag-NORs 主要分布于 1、2、3、4 Z 染色体上, 见图 3。通常每个细胞显示的 Ag-NORs 数目在 1~6 之间变化, 银染均数为 3.26, 众数为 3。公鸡与母鸡间差异不显著 ($P > 0.05$), 见表 2。

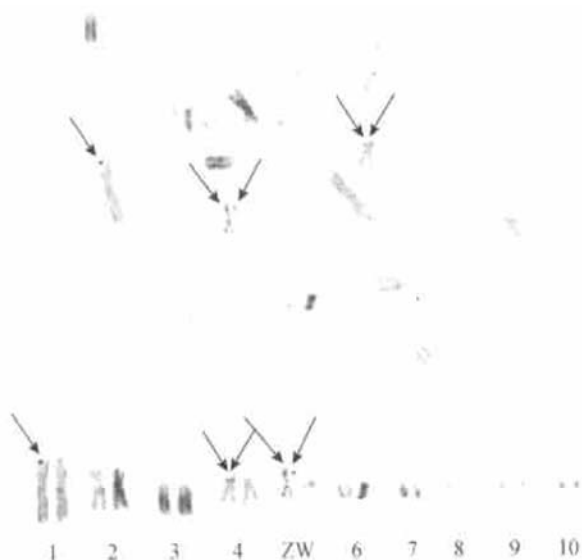


图 3 仙居鸡染色体核型(♀)示 3 个 Ag-NORs

Fig. 3 Xianju chickens' karyotype, showing 3 Ag-NORs

表 2 仙居鸡 Ag-NORs 数目和分布

Table 2 The number and distribution of Xianju chickens' Ag-NORs

性别 Sex	n	细胞数 NO. of cells	占细胞的百分比 Percent of NORs						$\bar{x} \pm s$	众数 Mode
			1NOR	2NORs	3NORs	4NORs	5NORs	6NORs		
♂	10	300	5.56	22.22	44.44	13.89	13.89	0	3.08 ± 1.08^A	3
♀	14	420	7.04	12.68	38.03	25.35	14.08	2.82	3.35 ± 1.17^A	3
♂+♀	24	720	6.54	15.89	40.19	21.50	14.02	1.87	3.26 ± 1.14	3

相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。The same letter means insignificantly different.

其二, 可能由于不同作者与本研究在染色体制备和显带方法不同, 而引起显带带纹有所不同, 傅金恋^[2]按 Pace 的方法进行显带, 而本研究采用的是外周血淋巴细胞培养法。其三, 可能是由于仙居鸡的某些染色体与其它品种染色体本身就有区别而造成的。其次, 在 G 带深染带的宽度上也有的差异, 在 3 号染色体近侧处, 仙居鸡出现一条宽带, 而在其它鸡种却未曾发现。染色体 G 带深染带为 S 期复制带, 异染色质含量丰富, 富含 AT 碱基对^[9]。由于异染色质扩增是禽类进化方式之一, 因此深染带宽度的差异可以反映异染色质在量上的差异, 进而反映种间染色体进化的差异, 为测定物种之间的亲缘关系提供依据。再次, 在研究中还发现, 某些对应带纹染色体上位置也有差异, 例如在 7 号染色体上, 仙居鸡在着丝粒处出现一条宽带, 而在乌骨鸡中却在端部发现

3 讨论

3.1 仙居鸡染色体 G 带带型特征

仙居鸡染色体 G 带典型特征是不同的带纹的大小、染色深浅存在较明显的差异。带纹分布相对较稀疏, 而且染色体的末端带有负染区, 这与前人所报道的基本一致^[2, 3], 但也存在一些差异。首先表现在带纹数目的差异, 在 2 号染色体上, 仙居鸡染色体长臂比乌骨鸡^[6]少 3 条深带, 比罗斯鸡、略阳鸡^[2]、家鸡、原鸡少 1 条深带。在 3 号染色体上, 比乌骨鸡^[6]少 3 条深带, 比家鸡、原鸡少 2 条深带, 比罗斯鸡、略阳鸡^[3]少 1 条深带。究其原因: 其一, 可能与染色体长度有关, 在本研究中发现: 带纹的精细程度与染色体分裂时期有着密切的关系, 为了得到精细的带纹, 笔者在制备染色体过程中, 在胰酶处理时间和浓度上做了大量探索, 研究结果发现: 随着染色体加长, G 带数目愈多, 带纹愈精细且带纹的变化愈大, 界标位置也会有变化, 随着分裂时期的推迟, 染色体凝缩变短, 带纹数目减少, 且易发生带纹的融合, 但带纹的融合并没有使带区和带间明显增大, 这种融合的结构变化机理和特点有待进一步研究。

一条大小形态极其相似的带纹, 这种对应条纹在染色体上位置的不同可能由于臂内倒位所致。另外, 在研究中还发现, Z 染色体可能是最保守的, 通过对 Z 染色体 G 带带型的量化处理, 发现地方鸡种 Z 染色体标准带数相差无几, 如罗斯鸡, 略阳鸡为 7 条深染带, 乌骨鸡与仙居鸡为 6 条深染带, 这与前人关于“原始 Z 染色体”的结论^[7]相一致。

3.2 仙居鸡 Ag-NORs 特征

本研究发现: 仙居鸡染色体的 Ag-NORs 常分布于 1p、3p、4p、Zp 和 2q 上, 这与乌骨鸡^[6]定位于 1p、2p、Zp 存在较大差异。仙居鸡染色体 Ag-NORs 均数 (3.26) 也比乌骨鸡^[6] (2.95) 高。原因可能有: 其一, 不同品种 Ag-NORs 均数和分布随地理位置的不同呈现一定变化。仙居鸡原产于浙江省仙居县, 而乌骨鸡原产于江西省泰和县。其二, 由 PHA 刺激而发

生的细胞分裂的外周血淋巴细胞有丝分裂中期染色体存在差异^[1], 鸡种间可能对 PHA 的敏感性程度不同。此外本次试验还发现 Ag-NORs 的大小、数目和分布存在多态性, 不仅个体的 Ag-NORs 的分布有差异, 而且同一个体不同细胞的 Ag-NORs 亦有明显差异。主要表现在: 其一, Ag-NORs 的数目不同, Ag-NORs 数目一般为 1~6 个不等, 其中 1 号染色体出现频率最高。其二, Ag-NORs 的大小不同, 一般 Ag-NORs 大小顺序为 2 号染色体 Ag-NORs 最大, 3 号染色体 Ag-NORs 最小, 1 号 Z 染色体 Ag-NORs 介于其中。若在 1 号染色体上出现 2 个 Ag-NORs, 一般表现为一大一小, 引起差异的原因, 主要是由于 Ag-NOR 量的变化不同^[11], 而 Ag-NOR 的量主要取决于核内 rDNA 转录活动的水平、染色体组中所携带的 NOR 的染色体数量、观察时期所处的细胞周期的阶段。通常是间期核仁的银染核仁最大, 前期和早中期染色体 Ag-NORs 次之, 中中期和晚中期最小^[12]。且并非所有 NOR 都能银染, 只是在功能上存在活性的 NOR 才能被银染色。其次是由于所合成的 rDNA 量的变化所造成的。一般认为银染颗粒大小可能是 NORs 中的 rDNA 基因含量不同所造成的, 银染强度与 rDNA 基因活性有关, 而常常是银染颗粒越大, 着色越深。现研究已证明 Ag-NORs 即为 18S + 28SrDNA 基因的分布区, 它揭示了细胞中有转录活性 rDNA 基因的数量和位点分布, 而 rDNA 基因转录的活性主要受有转录活性的基因数量和转录速度的影响^[13]。另外, 笔者在实验中有时发现 2 条染色体 Ag-NORs 联合现象, 根据 Miller 研究发现: 银染近端着丝粒染色体联合是 rRNA 基因活性大小的一个指标, 反映了 rRNA 基因的转录速度。在性别之间, 母鸡 Ag-NORs 数高于公鸡可能与细胞增生的情况^[14]有关, 从公鸡和母鸡的发育情况来看, 母鸡的性成熟时间较公鸡晚, 而取样时正好处于母鸡性成熟时期, 母鸡体内代谢强度、细胞增生分化程度在此阶段比

公鸡快。

参考文献:

- [1] 程光潮, 吴丽城. 家鸡染色体的制备及其组型观察[J]. 遗传, 1981, 3(1): 17~19.
- [2] 傅金恋. 家鸡染色体核型及 G、C-带研究[D]. 西北农业大学硕士研究生论文, 1989.
- [3] 郑喜邦. 尼克红鸡染色体性别鉴定的研究[D]. 西北农业大学硕士研究生论文, 1998.
- [4] 刘友清, 傅佩胜, 陈艳卿, 等. 寿光鸡染色体的研究[J]. 山东农业科学, 1993, (2): 13~15.
- [5] 张廷钦, 鲁平, 林世英, 等. 云南 10 个地方鸡种染色体核型比较研究[J]. 云南畜牧兽医, 1997, 2: 5~7.
- [6] 刘莉. 泰和乌骨鸡染色体核型、带型分析及其与生产性能相关性研究[D]. 扬州大学硕士研究生论文, 2002.
- [7] Shin O. KAMOTO, Yoshizane, MAEDE and Tsutomu Hashiguchi. Analysis of the karyotype of the green jungle fowl - gifu native fowl (female) hybrid[J]. Animal Science and Technology, 1991, 62(8): 735~741.
- [8] Shin O. KAMOTO, Yoshizane MAEDE and Tsutomu HASHIGUCHI. Analysis of the chicken quail hybrid[J]. Animal Science and Technology, 1991, 62(8): 742~748.
- [9] 石兴娣, 张正旺, 刘凌云. 三种马鸡的核型及染色体 G 带带型[J]. 动物学报, 2001, 47(3): 280~284.
- [10] 陈琳, 于汝梁, 陈幼春. 枫泾猪 G 带、C 带及银染核仁组织区(NOR)的研究[J]. 畜牧兽医学报, 1990, 21(4): 316~321.
- [11] 王玉, 张淑玲, 于海涛. 核仁组成区与肿瘤的关系[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2000, 21(5): 578~580.
- [12] 于汝梁, 辛彩云, 陈琳, 等. 长白猪、枫泾猪和它们的杂种后代 Ag-NOR 的研究[J]. 遗传学报, 1992, 19(4): 304~307.
- [13] 白文林, 马力. Ag-NORs 多态性及其在动物遗传育种中的应用[J]. 西南民族学院学报, 2000, 26(3): 324~329.
- [14] 毛国根, 叶少菁, 蔡剑, 等. 嗜银蛋白在矽肺纤维化过程中的意义[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1999, 17(3): 148~150.

Studies on Chromosome G Band and Ag-NORs of Xianju Chicken

CHEN Guohong¹, LI Bichun¹, XU Qi¹, ZHANG Xueyu², WU Xinsheng¹, LIU Li¹, JI Baohua¹
 (1. Animal Science & Veterinary Medicine College of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
 2. Institute of Poultry Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225003, China)

Abstract: In this study, the chromosome slides were made by improved peripheral blood lymphocyte culture-drying naturally method, and analyzed G-band patterns, Ag-NORs patterns of Xianju chickens. The results were as follow: Xianju

chickens' G-band of the first ten pairs chromosomes was divided into 30 regions and 144 bands, its character was described and its idiogram was depicted. Xianju chickens' Ag-NORs were located on 1p, 3p, 4p, Zp and 2q, the mean value per cell was 3.26 and the mode was 3. The size, number and distribution between different individuals and of the same individual were polymorphic and associations of Ag-NORs were found.

Key words: Chicken; Chromosome; G-Band; Ag-NORs



北京博大泰克生物基因技术有限责任公司 (中国分子生物学研究领域的专业化公司!)

北京博大泰克生物基因技术有限责任公司(BioDev-Tech. Scientific & Technical Co., Ltd)是一家主要从事分子生物学试剂盒、生化试剂、诊断试剂、生物制品等产品的研发、生产和销售以及分子生物学实验技术服务的生物高科技企业。公司拥有一支由长期从事生物基因技术研究工作的博士、硕士组成的专业研发队伍。在北京、上海、天津,我们与中国科学院、中国医学科学院、中国军事医学科学院、中国疾病预防控制中心、中国农业科学院(院本部,畜牧所,植保所,兰州畜牧兽医研究所等)、北京市与天津市动物检疫站、中国农业大学、北京大学、清华大学、复旦大学、上海交大、南开大学、林研所、北京林业大学、山东大学等全国 200 多家科研院所建立了供应协作关系,公司的产品和技术得到了客户广泛的认可和使用。在过去一年的时间里,我们与其它大专院校、研究所共同承担了 2 项国家自然科学基金资助的科研项目,接受了全国各地科研院所 9 位硕士、博士来公司进行学位课题的研究工作。我们服务宗旨:优质、高效、快速!

在六年的发展历程中,博大泰克公司还创造了多个科研成果:

1998 年,推出【玻璃奶 DNA 片段回收试剂盒】,其性能可与进口同类产品媲美,同时还提供三种不同类型的 DNA 片段快速纯化回收试剂盒;

1999 年,在北京市场率先推出国产【质粒小样快速提取试剂盒】;

2000 年,在国内市场率先推出【基因资源系列产品】;

2001 年,率先推出国产【感受态细菌细胞系列产品】以及可以和 Clontech 公司同类产品媲美的【高效杂交液】等产品;

2003 年起,公司投入了大量人力、物力进行产品项类的系统开发,争取早日与用户见面。

经营范围:

核酸提取与纯化试剂盒、杂交试剂盒(博大特色产品!)、克隆系统试剂盒(通用 RT-PCR 试剂盒等!)、载体与 T 载体、PCR 系统相关产品(Taq 酶, Pfu 酶, dNTPs 等)、各种核酸与蛋白质分子量标准、蛋白质研究相关试剂盒、各种生化试剂(X-Gal, IPTG, Tris, 丙烯酰胺, 甲叉, 甘氨酸, SDS, 尿素等 100 多种常规进口生化试剂)、基因资源(小、大鼠、人等 RNA, DNA, cDNA)、限制性核酸内切酶及实验室耗材、承接分子生物学实验技术服务以及硕士、博士学位课题和各种基金资助的项目

诚征经销商:

我们公司准备在以下城市发展经销商或开办办事处:重庆、广州、西安、长沙、武汉、长春、兰州、成都、济南。

望有意者来电来函咨询。

寻求合作:

博大泰克公司追踪国际先进技术,进行自主研制开发,立志为中国生命科学技术研究的发展做出自己的贡献。为了更好地、更全面的发展,我们渴望联合更多的专业技术人员研制出创新型的产品。

联系人:陈焱焱 电话:(010)68187792 68176582 传真:(010)68187842 E-mail: fhy70@yahoo.com

地址:北京市海淀区复兴路 61 号恒欣商务大厦主楼 401# 邮编:100036

欢迎广大科研工作者来函,来电索要公司产品目录以及新产品优惠价目表!!!