

文章编号: 1003-4692(2009)04-0281-03

【论著】

蚋类唾腺多线染色体制备方法的改进

黄丽, 张春林, 陈汉彬

【摘要】 目的 对传统蚋类唾腺多线染色体制备方法进行改进,以获得良好的制片效果。方法 选用经Carnoy's液固定的蚋成熟幼虫进行解剖、剥离唾腺,对传统蚋类唾腺多线染色体制备方法进行改进,包括改良染色液,使用冲洗液、背景净化液等新制剂和新步骤并得到清晰的蚋唾腺染色体图形。结果 用改进方法制备的蚋类唾腺多线染色体标本带型清晰,伸展良好。结论 改进的蚋类唾腺多线染色体制备方法可获得较满意效果,便于观察染色体形态和研究染色体结构变异等。

【关键词】 蚋科; 唾腺; 多线染色体; 制备方法

中图分类号: Q969.44

文献标识码: A

Improvement for the preparation of the polytene chromosomes of blackflies HUANG Li, ZHANG Chun-lin, CHEN Han-bin. Department of Biology, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550004, China
Corresponding author: ZHANG Chun-lin, E-mail: zcl@gmc.edu.cn

【Abstract】 Objective To improve the traditional preparation of the polytene chromosomes of blackflies and observe chromosomes abstracted. **Methods** Mature larvae of blackflies were selected, dissected and shelled out salivary glands. The traditional method was improved, and the clear polytene chromosomes slices were prepared after the use of new staining fluid, flush fluid and cleaning fluid. **Results** The improved method made chromosomes clearly and wholly in microscope. **Conclusion** The improved technique succeeded in the preparation of chromosome specimens of blackfly salivary gland, which was convenient for the observation of chromosomes shape and chromosomes variation in the laboratory.

【Key words】 Simuliidae; Salivary gland; Polytene chromosome; Preparation

蚋类(blackflies)是医学昆虫中一个世界性分布的重要类群。蚋类幼虫唾腺细胞中有多线染色体,其多态性和特异性的染色体带型已被广泛地应用于细胞遗传、系统分类、基因的定位以及基因结构的研究^[1]。近年来,蚋类细胞遗传学研究发展较快,迄今,在全球已知的1660种蚋中,已有311种做过细胞学研究,约占蚋种总数的19%^[2]。我国蚋类细胞遗传学研究明显滞后,仅见少量报道^[3-5]。这与蚋类个体比较小,染色体制备困难有一定关系。传统制备多线染色体的染色方法有2种^[6],一种是标准Feulgen染色法,另一种是应用乳酸、醋酸和丙酸处理后用地衣红或洋红染色法,两者都有一定的局限性。故本研究对传统制备方法进行了改进,包括改良了染色液,使用冲洗液、背景净化液等新制剂和新步骤,使染色体标本背景干净,染色体完整而清晰,取得良好的制片效果,更加易于染色体观察和分析。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 采集自野外的蚋成熟幼虫。将幼虫

标本保存在新鲜配制的Carnoy's固定液中,更换固定液2次。贮存于4℃冰箱中备用。

1.2 溶液配制

(1) 选用改良苯酚品红染色液,配制如下:

A液:称3g碱性品红溶于100ml 70%乙醇中(此液可长期保存);

B液:量取10ml A液,加入90ml 5%苯酚水溶液中(此液限2周内使用);

C液:量取45ml B液,加入6ml冰醋酸和6ml 37%甲醛;

D液:量取10ml C液,加入90ml 45%醋酸和1g山梨醇即制成改良苯酚品红染色液(放置2周后使用,染色能力显著增加)。

(2) 背景净化液:30%盐酸40ml、45%冰醋酸50ml、甘油10ml。

(3) 冲洗液:45%冰醋酸98ml、甲醛1ml、乙醇1ml、苯酚0.4g。

(4) 50%乙酸。

(5) 1mol/L盐酸溶液。

1.3 操作步骤

1.3.1 唾腺的剥离 取经Carnoy's液固定的成熟幼虫标本放到载玻片上,加2滴Carnoy's液,再将载玻片放到解剖镜下。用解剖针从虫体的后环做一个腹面切口,将唾腺从幼虫腹部拉出,于载玻片上滴加2~3滴

基金项目:国家自然科学基金(39460073)

作者单位:贵阳医学院生物学教研室(贵阳 550004)

作者简介:黄丽(1979-),女,硕士,讲师,主要从事医学昆虫分类和细胞遗传学研究。E-mail: lihuang1979@126.com

通信作者:张春林,男,教授。E-mail: zcl@gmc.edu.cn

50%乙酸,放置 30~120 s。

1.3.2 解离 将腺体放入 1 mol/L 盐酸中浸泡 2~5 min,软化唾腺上的脂肪组织。

1.3.3 漂洗 用吸水纸吸去唾腺上的盐酸溶液,加上 1 滴蒸馏水于腺体上约 1 min 后再用滤纸吸干水分,重复 3~4 次即可洗净残留的盐酸。

1.3.4 去背景 将背景净化液滴加到载玻片上,用镊子夹持载玻片,在酒精灯上微烤约 3 s,以净化染色体背景。倾斜载片,滴冲洗液数次,彻底冲掉背景净化液。

1.3.5 染色 将腺体移到新的凹玻片上,滴加 2~3 滴改良苯酚品红染色液,放置 20~30 min。

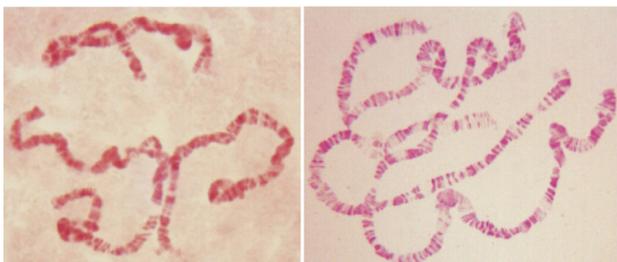
1.3.6 压片 制片前将干净无油的载玻片放入 0~4 °C 冰箱中处理 1~2 h,将染色好的唾腺迅速置于冰冷的载玻片上,并滴加 1~3 滴 50% 乙酸,用解剖针将腺体腔中胶冻样物质去尽,立即加盖盖玻片,随后覆盖吸水纸,用拇指适度用力垂直按压,染色体即可分散开。

1.3.7 镜检 压好的临时片直接在显微镜(1000×)下观察,摄影。

1.3.8 永久片制作 将分散好的唾腺染色体装片用冰冻法揭片,滴加冲洗液冲去染色液,择带有材料的载片或盖片,分别经过乙醇及冰醋酸(3:1)1次、无水乙醇2次、无水乙醇及二甲苯(1:1)1次,二甲苯2次,每次各 2~3 min。最后用中性树胶封固,即成为永久性制片。显微镜(1000×)下观察,摄影。

2 结果

将上述制得的标本置于显微镜下观察。从细胞分散度、染色体分散度、染色体形态等方面进行比较,结果确定。制成的多线染色体标本片中染色体臂充分伸展,分散良好,染色体带纹清晰,染色带呈紫红色不等,间带着色,细胞质不着色,染色体背景干净明亮(图 1),便于观察染色体形态和研究染色体结构变异等。



改进前

改进后

图 1 改进前后的黔蚋(*Simulium (Simulium) qianense* Chen and Chen)唾腺多线染色体(同一孳生地)

3 讨论

3.1 染色方法 传统制备多线染色体的染色方法有 2 种,一种是标准 Feulgen 染色法^[7],该法的优点是通常

只对细胞核和染色体着色,染色均匀一致,背景清晰,组织软化较好,易于压片;缺点是在压片时染色体不易分散而易于重叠或粘连,并且水解条件必须严格控制,否则影响染色效果。另一种是应用乳酸、醋酸和丙酸处理用地衣红或洋红染色法^[8,9]。其优点是醋酸洋红或地衣红的配制和染色都比较简单,对细胞穿透力较强,染色体和核仁均可染色。但其染色强度和分色效果不及其他染色剂,通常只作临时染色观察,不用于制作永久性装片。而本研究选用改良苯酚品红染色法^[10,11],该染色法既具有醋酸洋红的染色简便、快速的特点,又同时具有 Feulgen 染色法分色清晰的优点。用此法制得的染色体具有耐保存、高稳定、持久不褪色的优点,这是前 2 种染色方法所不及的。虽然其缺点仍然是染色效果与盐酸的解离条件密切相关,但对温度条件不是很苛刻。另外染液的配制和保存也比 Schiff 试剂简单,而且其染色能力随着放置的时间越久染色效果越好。

3.2 背景净化液的使用 对蚋幼虫唾腺的染色,以往无论采用何种染色液,如醋酸洋红、改良苯酚品红等,都会因细胞质着色使染色体背景底色深重,既不美观,又影响染色清晰度和观察效果。为了克服这一缺点,本研究配制和使用了背景净化液^[12],其成分为盐酸、冰醋酸、甘油,呈酸性,能分解细胞质成分,故在染色过程中,细胞质不着色,背景清晰,图像层次分明。在背景净化液中加入甘油,因其不易挥发,使得玻片标本不易干涸,提高了制片的成功率,同时甘油能增加玻片标本的清晰度,使得片子更加美观。

3.3 冲洗液的使用 本方法中使用的冲洗液^[13],除不含有碱性品红和山梨醇之外,其余成分近似于改良苯酚品红染液,既适用于染色前后冲洗,也适用于压片之后将盖片脱落,可防止在脱盖片时易出现的细胞散落。

3.4 载玻片冰冻处理^[14] 采用经过 0~4 °C 冰箱处理后的载玻片压片更有利于染色体臂的充分伸展,几乎每张装片中都可以找到伸展良好的染色体,并且装片背景干净,清晰,更适合显微摄影。

因此,上述多线染色体制备方法的改进为获得染色清晰,背景干净,染色体臂充分伸展的玻片标本打下了良好基础,便于观察染色体形态和研究染色体结构变异等。

参考文献

- [1] 陈汉彬,安继尧. 中国黑蝇(双翅目:蚋科)[M]. 北京:科学出版社, 2003:230-232.
- [2] Chubareva LA, Petrova NA. Karyotypes of blackflies (Diptera: Simuliidae) of the World[J]. Entomol Review, 2003, 83(2): 149-204.
- [3] 张春林,陈汉彬. 五种常见蚋核型研究(双翅目:蚋科)[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2000, 7(1): 55-59.
- [4] 温小军,韦静,陈汉彬. 河南纺蚋多线染色体研究[J]. 四川动物,

- 2007, 26(3):525-527.
- [5] 温小军, 韦静, 陈汉彬. 五条蚋两地理株多线染色体比较研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(3):253-255.
- [6] Rothfels KH. Cytotaxonomy of black flies (Simuliidae)[J]. Ann Rev Entomol, 1979, 24:507-539.
- [7] Bedo DG. Cytogenetics and evolution of *Simulium ornatipes* Skuse (Diptera: Simuliidae). I. Sibling speciation [J]. Chromosoma, 1977, 64:37-65.
- [8] Porter DL, Martin J. The cytology of *Polypedilum nubifer* (Diptera: Chironomidae)[J]. Caryologia, 1977, 30:41-62.
- [9] Krüger A. An alternative protocol for the preparation of the polytene chromosomes of larval *Simulium damnosum* s.l. (Diptera: Simuliidae) [J]. Ann Trop Med Parasitol, 2003, 97(6):657-660.
- [10] 邵刚. 果蝇唾腺染色体的几种染色方法比较[J]. 生物学通报, 2003, 38(1):53-54.
- [11] 何兰花, 卢家现. 用改良苯酚品红染色液替代醋酸洋红染色液的研究[J]. 生物学杂志, 2000, 17(2):28-29.
- [12] 赵惠玲, 王清, 李秀芬. 制备果蝇唾腺染色体标本片的改进方法[J]. 生物学通报, 1995, 30(10):39.
- [13] 赵惠玲. 改良果蝇唾腺染色体制片法[J]. 太原师范学院学报(自然科学版), 2003, 2(1):82-84.
- [14] 汪澜, 贾桂珍. 用改良苯酚品红染色液改进果蝇唾腺巨大染色体制片法[J]. 塔里木农垦大学学报, 2003, 15(3):7-9.

[收稿日期:2009-03-12]

文章编号:1003-4692(2009)04-0283-01

【疾病控制】

一起猪咬伤后狂犬病致死病例调查

An epidemiological investigation on fatal rabies case after bitten by pig

韩成星¹, 易槐明², 付美华²

中图分类号:R181.3

文献标识码:B

2007年10月27日,浙江省常山县天马镇某村发生猪咬人的狂犬病致死病例,现将流行病学调查结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 资料来源 常山县疾病预防控制中心(CDC)档案室流行病学个案调查表及调查报告和衢州市人民医院、常山县人民医院患者个案住院病历。

1.2 诊断标准 依据《狂犬病诊断及处理原则》GB 17014-1997,病例经市、县人民医院临床诊断和市、县CDC复核确定。

1.3 方法 按照《浙江省狂犬病应急调查处置技术方案》开展流行病学调查。

2 结果

2.1 基本情况 常山县天马镇某村共有农户350户,1250人。患者家有王某夫妇、儿子、儿媳及孙子共5人;家养幼犬、仔猪各1只;2007年9-10月间王某夫妇及孙子3人先后被家养仔猪、幼犬咬伤。

2.2 临床资料 王某,男,57岁,农民,于2007年10月20日17:00发病,22日21:00到常山县人民医院就诊,被诊断为“疑似狂犬病”,11时转入衢州市人民医院急诊科,23日入住传染病房。患者于10月27日21:00左右经救治无效死亡,病程7d。死亡诊断为狂犬病。患者入院后体温36.7℃,心率70次/min,血压164/108 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa),意识清楚,但精神紧张,狂躁,两眼凝视,心律齐,双肺未闻及啰音,喘鸣样呼吸,咳嗽、咳痰明显,吐大量白色黏液痰,偶有肢体阵发性痉挛,感胸闷不适,但拒绝吸氧,偶有胡言乱语,幻听,怕风,怕水,但怕光不明显。血常规结果:WBC $15.1 \times 10^9/L$,中性粒细胞83.6%;胸片、心电图均无异常。

2.3 流行病学调查结果

作者单位:1 浙江省常山县人民医院防保科(常山324200); 2 常山县疾病预防控制中心

作者简介:韩成星(1954-),男,浙江常山人,副主任医师,主要从事流行病学和疾病预防控制工作。E-mail: qzcsan@126.com

2.3.1 猪咬伤暴露史及暴露后处置情况 9月27日晚家中仔猪从栏内跑出,28日早上未归栏,患者在抓仔猪回栏时右手虎口被咬,皮肤破损,但无明显出血。被仔猪咬伤后,伤口仅用清水冲洗,未进行规范处理,未接种狂犬病疫苗和抗狂犬病免疫球蛋白或免疫血清。10月20日17:00发病,潜伏期22d。

2.3.2 伤人动物调查情况 患者家养幼犬于2007年7月从本村村民家买来,9月2日出现烦躁、外出不归等异常现象。9月3-4日,先后攻击患者王某的妻子(于2007年11月7日发病,11月9日晚症状加重,19:00以“疑似狂犬病”收入常山县人民医院,11月10日2:00经救治无效死亡,死亡诊断为狂犬病)和孙子,4日当天幼犬被打死;据查该犬未伤及其他人,同窝生产的其他幼犬无异常表现。仔猪是患者于9月2日从本村购买,9月2-4日与幼犬共栏圈养3d,9月27日仔猪多次从栏内跑出,29日9:00不明原因死亡,调查结果此仔猪也未伤及其他人,同窝生产的其他仔猪无异常表现。

3 讨论 2007年10月27日,浙江省常山县天马镇某村发生猪咬人的狂犬病疫情,这是本县自1990年以来再次发生狂犬病疫情。伤人动物仔猪和幼犬在病家共同圈养3d,且在伤人前有反常行为,其中仔猪伤人后又不明原因死亡,幼犬因先后攻击患者的妻子及其孙子后被打死。患者王某被猪咬伤后伤口仅用清水冲洗,未进行规范处理,未接种狂犬病疫苗和抗狂犬病免疫球蛋白或免疫血清而死亡。王某的孙子在犬伤暴露后,及时到常山县CDC进行伤口处理,并接种了狂犬病疫苗和注射人抗狂犬病病毒免疫球蛋白,到目前尚未发病。

我国狂犬病的疫源动物主要是犬,其次是猫,其他动物则很少。本次调查结果,是一起由猪咬人的狂犬病疫情。以猪传人的狂犬病暴发疫情报道不多。为此,猪伤人也应该引起足够的重视。要加强对猪等畜类圈养管理。同时加强宣传教育,普及狂犬病的防治知识,提高群众的自我防护意识与能力,在犬伤暴露后,应及时规范处理伤口,并到医疗机构接种狂犬病疫苗和注射抗狂犬病血清或人抗狂犬病病毒免疫球蛋白。

[收稿日期:2008-12-28]