

大鳞副泥鳅粗线期二价染色体分带研究*

常重杰^① 杜启艳^① 余其兴^②

(^①河南师范大学生命科学学院 新乡 453002; ^②武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

摘要:报道了一种鱼类二价体显带的新方法。采用 pH 值在 7.2~7.4 之间的低渗液对大鳞副泥鳅精巢进行整体长低渗、卡诺固定液处理方法得到了粗线期二价染色体的高分辨 G 带,其带纹特征和数目相对稳定且清晰可辨。与胰酶显带法和 EDTA 显带法相比具有操作简单、耗时短以及二价体分散相对较好等特点。这一方法在所有显带方法中最为简便。

关键词:大鳞副泥鳅;粗线期染色体;碱性低渗液显带法

中图分类号:Q953 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2001)01-23-04

Pachytene Chromosome Banding of *Paramisgurnus dabryanus*

CHANG Zhong-Jie^① DU Qi-Yan^① YU Qi-Xing^②

(^①College of Life Sciences, Henan Normal University Xinxiang 453002;

^②College of Life Sciences, Wuhan University Wuhan 430072, China)

Abstract: A new method for Pachytene chromosome G-banding was reported in this paper. The whole testis was treated with basic hypotonic solution (pH 7.2~7.4) for 4~6 h, then treated with Carnoy's solution for 3~4 times. The cell suspensions were discarded on cold slides. The high-resolution G-bands of meiotic pachytene chromosome in *Paramisgurnus dabryanus* was obtained after dyed with Giemsa. The characteristic and numbers of bands were stable and distinct. Compared with trypsin or EDTA-treated methods, this protocol is the simplest one with operation-simple, less time-needed and high rate of success.

Key words: *Paramisgurnus dabryanus*; Pachytene chromosome; Banding method with basic hypotonic solution

在脊椎动物中,鱼类的染色体较小,数目偏多,研究工作难度大。60年代特别是70年代中期以来,由于染色体制备方法学上的改进,使鱼类染色体研究工作取得了长足进展。迄今已对2000余种鱼类进行了染色体分析,但其中绝大多数偏重于常规的核型分析。运用染色体多重带技术(特别是高分辨带技术),显示出每条染色体纵向上的精细带纹,可用于准确的鉴别和区分各条染色体以及染色体片段,能对染色体的微小结构变异进行精细分析,并能对原

位杂交法的基因定位进行详细作图,这些技术已在人类及哺乳类染色体研究中取得了巨大成功。然而,鱼类染色体多重带显带的技术却落后甚远。从70年代中期开始,陆续有这方面的尝试工作报告,许多学者试图借鉴在哺乳类中已成功的G带、Q带、R带、复制带、高分辨带、

* 国家自然科学基金(No. 39770407)资助课题的部分工作;
第一作者介绍 常重杰,男,35周岁,教授,博士;研究方向:
遗传学;

收稿日期:1999-07-01,修回日期:2000-10-23

内切酶带等多重带显带技术,应用于鱼类体细胞染色体研究,虽然其中也有一些是较成功的探索,但就其带纹数量、显带质量以及显带方法的稳定性而言,均未达到理想的效果^[1]。部分学者甚至断言由于进化地位较低,鱼类染色体不能显示出多重带纹。然而也有部分学者认为其原因在于方法学而非染色体本身^[2]。1993年,余其兴等人鉴于鱼类有丝分裂染色体分带的研究现状提出应跳出传统的思维模式,率先运用全新的思路,以减数分裂粗线期二价体为研究对象,获得了黄鳝的良好高分辨带,而且其带纹特征和数目是稳定可靠的,并在鱼类中首次对二价体进行了区带划分和识别特征的描述,为鱼类细胞遗传学研究开创了一个全新的领域,对于鱼类基因组精细结构和基因定位的研究都具有重要的意义^[3]。然而黄鳝就其染色体数目而言是比较特殊的,其 $2n$ 数仅为24,粗线期二价体数为12,因此在制备染色体标本时相对比较容易。鱼类中80%以上的种类其染色体数目都在40~60之间^[1]。因此余其兴等人的方法是否适用于这些染色体数目较多的鱼类呢?为此我们选择染色体数目具有代表性的小型鱼类——大鳞副泥鳅,对其二价体的制备和分带进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 材料 性成熟的雄性大鳞副泥鳅购自武汉市农贸市场,采集时间为5~11月份。每条重约20~50 g。

1.2 方 法

1.2.1 减数分裂染色体标本的制备 参照余其兴等人的方法稍加改进^[3]。取出发育成熟的精巢,迅速在0.85% NaCl中洗净血污并剥除粘连的结缔组织,然后以0.45%柠檬酸钠:0.075 mol/L氯化钾(1:1 v/v)混合液,室温下低渗4~6小时,在此期间可见有许多精子从精巢中逸出,更换低渗液直至无明显量的精子出现。再以卡诺氏固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定三次,每次20分钟。将精巢剪碎,取上部细胞悬液以1 000 r/min离心10分钟,重复两次。

常规空气干燥法制片。

1.2.2 显带处理 尝试的方法有三种,(1)EDTA法:取适度老化的标本(室温存放1个月以上或新片于50℃烤箱中处理24小时)于20 mmol/L EDTA(pH 8.0)中60℃ 30~50分钟,蒸馏水冲洗后以1:10 Giemsa染色20分钟;(2)常规胰酶消化法:经0.075 mol/L KCl低渗处理后的精巢组织直接用卡诺固定液(甲醇:冰醋酸=3:1 v/v)固定两次每次30分钟;常规制片,经烤片后胰酶消化,Giemsa染色;(3)碱性低渗液处理法:这是在尝试各种低渗方法时偶然发现的,具体方法是,以5 mol/L氢氧化钠调节0.45%柠檬酸钠:0.075 mol/L氯化钾(1:1 v/v)混合低渗液的pH值为7.2~7.4,室温下低渗处理2~4小时,经卡诺氏固定液整体固定两次后,将精巢剪碎,取上部细胞悬液以1 000 r/min离心10分钟,重复两次,常规空气干燥法制片,Giemsa染色。

1.2.3 显带染色体组型分析 选择分散良好,带纹清楚的中粗线期的完整分裂相进行显微摄影、测量和排列分析,根据各个分裂相的测量结果,分别算出每条二价体的相对长度和标准误,并根据10个细胞的二价体G带带纹特征比较,绘制大鳞副泥鳅二价体的G带核型模式图。

2 结果与讨论

2.1 大鳞副泥鳅粗线期二价体分带 经EDTA显带法(图版I:1)、胰酶消化显带法(图版I:2)和碱性低渗法处理后(图版I:3,4),在大鳞副泥鳅粗线期二价体上发生了明显的带纹分化,显示出十分丰富的多重带型。带纹清晰,反差明显。在同时相不同分裂相中,带型基本稳定。粗线期二价体大致可以分为早中晚三个时期。每个时期取10个分散较好的分裂相,统计其相对长度、带纹显示情况。中粗线期分带结果列于表1。带纹总数为414条。粗线期二价体的带纹可以分为强深染带、深染带和浅染带三类。下面对几条较特殊的二价体进行描述。

1号二价体在着丝粒区有一较宽的强深染带,这是一个非常明显的特征。即使在一些分

带较差的分裂相中也可以很容易识别出这一带纹,并把该二价体与其它二价体区分开。

6号二价体长臂的分带比较特殊。在长臂上带纹较多,但其上的深染带与浅染带区分不明显,整条臂显得着色很浅。而7号二价体正好相反,其上的深染带都十分明显,与浅染区的反差十分强烈。

16号二价体为端部着丝粒,其臂上有很长的强深染带,该带占整条二价体的1/3左右。

23号二价体上带纹数目最少。在着丝粒部位有一较小的深染带,紧接着是一很窄的浅染带;所有余下的部分为一条带,呈深染,其间看不出有带纹分化。如此的带纹特征是极少见的。

表1 大鳞副泥鳅粗线期二价体相对长度及显带结果

二价体 编号	相对长度	高分辨带			带纹总数	二价体 编号	相对长度	高分辨带			带纹总数
		强深染带	深染带	浅染带				强深染带	深染带	浅染带	
1	7.41 ± 0.93	2	16	18	36	13	3.58 ± 0.73	5	1	6	12
2	5.3 ± 0.45	1	7	8	16	14	3.48 ± 0.17	1	8	8	17
3	5.01 ± 0.63		12	13	25	15	3.48 ± 0.91	1	6	8	15
4	4.45 ± 0.09	3	9	12	24	16	3.33 ± 0.47	1	7	8	16
5	4.26 ± 0.85	4	6	9	19	17	3.29 ± 0.09		7	6	13
6	8.09 ± 0.43	1	12	14	27	18	3.27 ± 0.49		7	6	13
7	7.18 ± 0.35	1	16	17	34	19	3.17 ± 0.27		6	7	13
8	5.42 ± 0.51	3	9	11	23	20	3.10 ± 0.58		6	7	13
9	4.29 ± 0.47		8	8	16	21	2.98 ± 0.27		6	7	13
10	4.26 ± 0.23		9	9	18	22	2.42 ± 0.15		4	4	8
11	4.04 ± 0.31		8	7	15	23	2.13 ± 0.87		2	1	3
12	4.04 ± 0.89		9	8	17	24	2.03 ± 0.43	1	3	4	8

2.2 大鳞副泥鳅粗线期二价染色体的制备

以粗线期二价体为研究对象,进行多重显带具有许多有利因素。比如该期的染色体螺旋化程度较低,可以从中选出长度适中的分裂相,无需经过任何药剂的诱导处理即可用于显带,而且由于同源染色体的紧密配对,二价体仅为体细胞染色体数目的一半;同时进行减数分裂的细胞有天然的区域同步化趋势,只要取材时期适宜,可以很容易地获得大量的粗线期分裂相。但正是由于在粗线期时染色体较长,相互之间彼此缠绕,使得较难获得分散良好的分裂相。因此如何提高二价体的分散程度成为进行二价体分带的关键。余其兴等人应用整体长低渗法在黄鳝中获得了良好的结果。但是应用同样的方法在进行大鳞副泥鳅二价体分带时所获结果并不理想,主要原因在于其染色体数目为48,比黄鳝多一倍,分散颇不易。为此,我们在余其兴等人方法的基础上进行了多种探索,发现把低渗液 pH 值调高对二价体的分散有一定的作

用,分散良好的分裂相约占总分裂相的10%,基本可以满足带型分析和基因定位的需要。此种方法获得的标本经普通 Giemsa 染色后,以显示出清晰的带纹。用快速银染法染色后带纹清晰,NORs 区域明显(图版 I:5,6)。这种方法可以直接获得二价体的多重带,简单方便。所得带纹与经 EDTA 和胰酶法显示的基本一致。

在进行二价体分析时的另一问题是如何将有丝分裂核型与减数分裂二价体核型对应起来,我们采用的是相对长度对应法。人类 t_1 统计表明,相对长度的测量在二价体和有丝分裂染色体之间是非常一致的,因此只要进行精细的相对长度的统计这个问题不难解决。另外,用C显带法确定着丝粒的位置也是解决这个问题的办法之一。

有关人类和鼠的二价体研究业已证明,二价体上的染色粒结构带型是与有丝分裂高分辨带带型高度对应的^[4,5]。粗线期二价体上的染

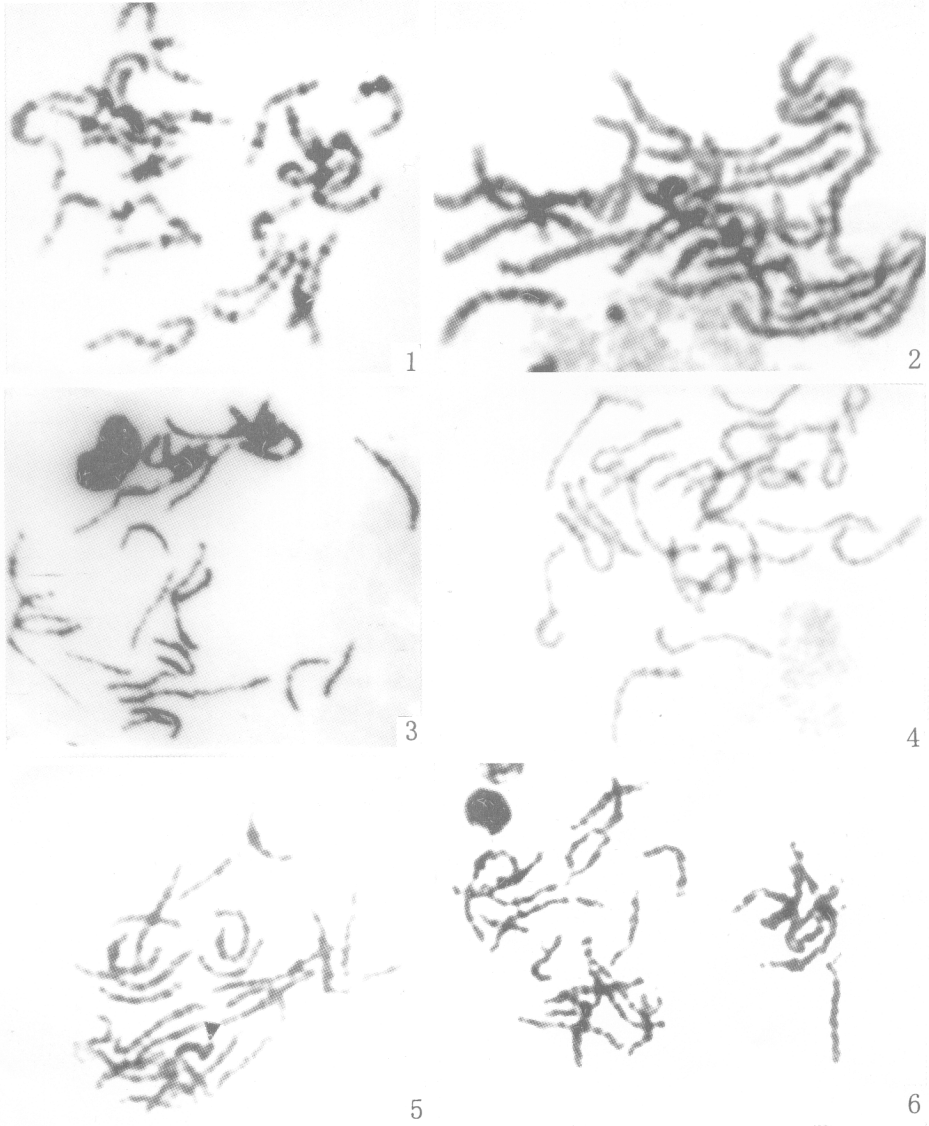
色粒是其显微水平的基本结构特征,它的位置分布和碱基组成是与有丝分裂 G 带中的深染带纹基本吻合^[6,7]。相信以染色粒结构为显带基础的粗线期二价体染色体多重带技术,将会克服鱼类有丝分裂染色体不利于进行多重带显带的客观条件,为鱼类、两栖类动物以及植物的多重带研究开辟一条新的更为简捷的途径。

2.3 碱性低渗液显带法的可能机制 为什么碱性低渗液处理后就能显示出清晰的带纹呢?发现这一现象以后,马上用同样的方法处理有丝分裂染色体,但没有出现带纹分化。一般认为染色体本身在各个部位有一定的分化,各种显带法的作用使这一分化加强。根据这一基本思路,可以认为减数分裂染色体上的染色粒可能是这一显带法的结构基础。染色粒是所有动植物减数分裂染色体上的共同结构形式,一些碱性蛋白质可能参与了其凝集过程。因此,碱性低渗液直接显带法的机理可能在于这些碱性蛋白被抽提出来,使得二价体的着色发生分化。实验结果表明当低渗液的 pH 高于 7.6 时染色体将呈现空泡状结构从而支持了这一观点。至于为什么有丝分裂染色体用此方法不能显示出

带纹,原因可能在于:两种染色体在凝集过程所涉及的蛋白质有一定的差异;有丝分裂染色体凝集程度太高,局部虽有分化但不能被观察到。

参 考 文 献

- [1] 余先觉,周嫩,李渝成等. 中国淡水鱼类染色体. 北京: 科学出版社, 1989. 1~20.
- [2] Luciani, J. M., M. R. Guichaoua, M. R. Morazzani. Complete pachytene chromomere karyotypes of Human spermatocyte bivalents. *Hum. Genet.*, 1984, **66**: 267~271.
- [3] 余其兴,樊连春,崔建勋等. 黄鳍二价体染色体高分辨 G 带制备及模式图构建. 中国科学(B), 1993, **23**(9): 947~954.
- [4] Georgiana, M. J., Jye-Siung Fang. Complete autosomal chromomere maps of Human early and mid/late pachytene spermatocytes. *Am. J. Hum. Genet.*, 1982, **34**: 112~124.
- [5] Luciani, J. M., M. R. Morazzani, A. Stahl *et al.* Identification of pachytene bivalents in human male meiosis using G-banding technique. *Chromosoma (Berl.)*, 1975, **52**: 275~282.
- [6] Jye-Siung Fang, M. Georgiana Jagiello. The chromomere map of the pachytene spermtocyte of the Turkish hamster (*Mesocricetes brandti*). *Genome*, 1991, **34**: 626~630.
- [7] Jhanwar, S. C., J. P. Burns, M. L. Alonso *et al.* Mid-pachytene chromomere maps of human autosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1982, **33**: 240~248.



1. 用 EDTA 显带法显示的带纹(The banded pachytene bivalents produced by EDTA); 2. 用胰酶显带法显示的带纹(The banded pachytene bivalents produced by trypsin); 3,4. 用碱性低渗液法显示的带纹(The banded pachytene bivalents produced by basic hypotonic solution); 5,6. 用碱性低渗液显带后经银染显示的带纹,▲所指为核仁组织者区域(The Silver-staining of banded pachytene bivalents produced by basic hypotonic solution,▲shows the Ag-NORs)