

陆生软体动物染色体制备方法学探讨

孙 涛

(中国医学科学院实验动物研究所 北京 100021)

摘要 本文对陆生软体动物染色体制备方法作了较详尽地讨论,并结合灰巴蜗牛染色体制备,对原有方法作了部分改进。确定了适宜于陆生软体动物染色体制片的取材时期为5月、8月和9月,秋水仙素作用浓度为 $3-5\mu\text{g}/\text{ml}$,用温浴方法低渗,固定采用甲醇、冰醋酸梯度固定,并运用火焰干燥法制片,可以得到较理想的染色体分裂相,为陆生软体动物染色体遗传研究打下了实验基础。

关键词 陆生软体动物 染色体制备 火焰干燥法

本世纪初,随着遗传学的进展,传统的系统学与生态学、细胞生物学、生物化学等学科的紧密结合,为软体动物系统学和进化生物学研究注入了生机,以染色体(Chromosome)为依据探讨系统分类的细胞分类学(Cytotaxonomy)也逐步建立起来。软体动物染色体数目和核型(Karyotype)资料的大量积累,将为分类学研究及确定种的进化地位提供可靠的依据。但这项研究的前提是,必须得到分散良好的染色体分裂相。

到本世纪30年代,软体动物染色体的报道依然很少,仅M. Perrot陆续报道了Helicidae这一科的染色体数为 $n=21-30$ 不等^[1]。截至1959年,整个软体动物门也仅报道了约150种的染色体^[2]。这个时期软体动物染色体研究之所以进展缓慢,一是软体动物新陈代谢较缓慢,活组织中处于分裂期的细胞较少,很难获得满意的分裂相;二是因为当时还未找到一个理想的染色体制备方法。

1968年,Burch以*Helix pomatia* ($2n=54$)的性腺组织为材料,采用压片法(Squash

method)得到了理想的结果^[3,4]。之后,空气干燥法(Air-drying)、火焰干燥法(Fire-drying)的推广运用,使制片方法更简便,结果更准确。迄今,已查明染色体数目的软体动物近800余种,其中腹足纲106科,297属700余种^[2]。

在我国,软体动物染色体研究较少,且仅涉及海洋种类^[5]和少数淡水种类^[6,7,8],陆生种类尚未见公开报道。本文探讨了陆生软体动物染色体制备方法,为进一步研究陆生软体动物染色体遗传学,提供了方法学基础。

1 材料和方法

1.1 材料 灰巴蜗牛(*Bradybaena ravida*)于5月至9月野外采集于陕西省泾阳县。采回的标本置于实验室饲养。制备染色体前,随机挑选较活跃的个体,测量壳高、壳宽和螺层数。

1.2 方法 敲碎螺壳,取出两性腺,在螺类缓冲液(自周敏等的配方^[7])中洗净。转入离心管,加入浓度分别为 $0.4-0.6\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $3-5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的秋水仙素溶液,室温下($20-25^{\circ}\text{C}$)

静置 3—5 小时。分别加入室温及 30℃、37℃ 预温的浓度为 0.037mol/L 的 KCl 溶液,低渗处理 1 小时、2 小时和 4—6 小时。低渗过程中将性腺组织尽可能剪碎。后用新配制的甲醇、冰醋酸溶液作梯度固定,甲醇-冰醋酸比例分别为 1:1,2:1 和 3:1,每次固定 10 分钟,并在每次固定后于 800—1000rpm 下离心 10 分钟。取预先制冷的洁净载玻片(载玻片上有层

薄冰),于适当高度滴片(约 20cm),火焰干燥法制片。Giemsa 染液染色 30 分钟。

2 结 果

2.1 分别对大小不同的灰巴蜗牛进行实验(表 1),最后确定壳宽为 8.3—13.0mm,螺层数 5.5 的个体较易获得满意的分裂相。

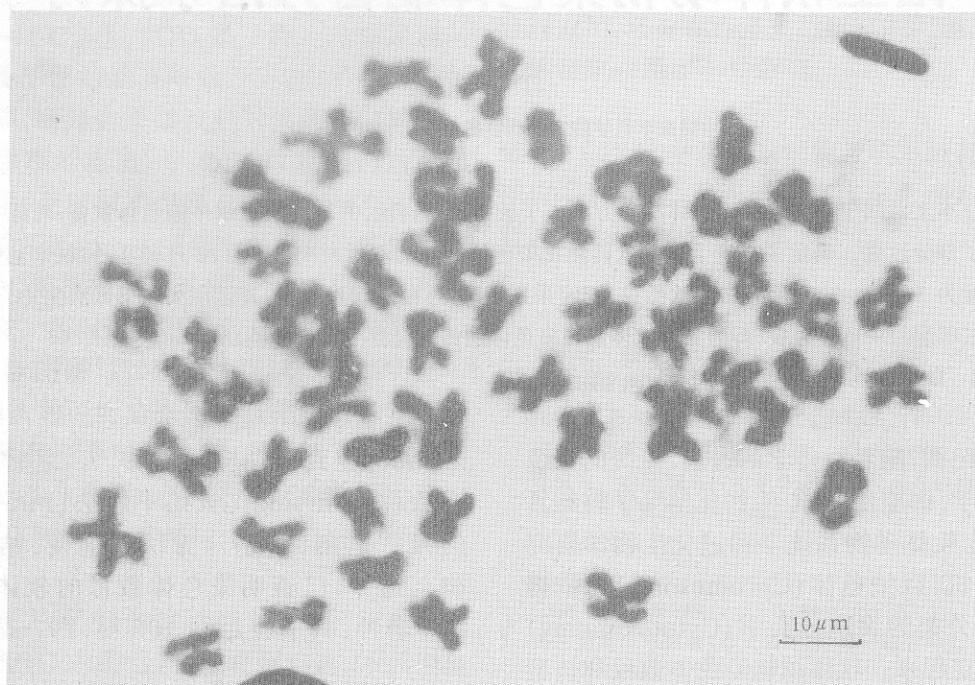


图 1 灰巴蜗牛中期染色体 ($2n=58$)

表 1 灰巴蜗牛取材测量值

壳宽(mm)	>13.0	13.0—8.3	<8.3
壳高(mm)	>10.6	10.6—5.8	<5.8
螺层数	5.5	5.5	<5.5
个体数	16	>60	26

表 2 灰巴蜗牛染色体数目统计

染色体数($2n$)	54	57	58	60	61	合计
细胞数	1	2	26	2	1	32
百分率(%)	3	6	82	6	3	100

2.2 挑选 32 个染色体分散较好的分裂相计数(见表 2),得到灰巴蜗牛较稳定的染色体数目为 $2n=58$ (见图 1)。

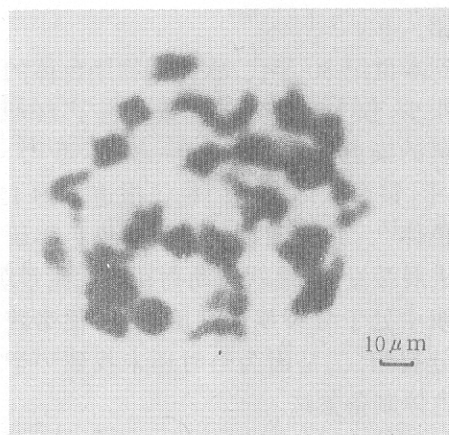


图 2 灰巴蜗牛减数分裂 I 前中期染色体 ($n=29$)

2.3 图2为灰巴蜗牛减数分裂I前中期的情形($n=29$)。在减数分裂I前期同源染色体联会,由 $2n$ 条单价体变为 n 条二价体(Bivalents)。前中期染色体高度浓缩、二价体紧密结合。

3 讨论

3.1 取材 染色体制片的关键在于取材个体的大小和取材时期。由于陆生软体动物代谢较缓慢,故繁殖前、后期的性腺便是较理想的取材组织。经实验得出,对于灰巴蜗牛,当年5月和8、9月间,性腺处于分裂期的细胞较多,较易获得满意的分裂相。并且大小适中(壳宽13.0—8.3mm,壳高10.6—5.8mm)的蜗牛,性腺组织中细胞分裂较旺盛。蜗牛过大,性腺已完全成熟;蜗牛过小,性腺组织活动处于相对停滞状态,获得分裂相均较少。

3.2 秋水仙素作用 秋水仙素通过改变细胞质内的粘度,抑制细胞分裂时纺锤体的形成,使细胞分裂处于中期^[9]。这是为了获得更多中期分裂相常选用的试剂。本文采用0.4—0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和3—5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 两个浓度,最后确定秋水仙素浓度为3—5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 较为理想,作用时间为3—5小时。

Sharma^[10]认为秋水仙素作用与温度有关,温度在8—9 $^{\circ}\text{C}$ 效果最佳,得到中期分裂相最多。当温度升至43.3 $^{\circ}\text{C}$,秋水仙素则无作用。本实验保持在室温下(20—25 $^{\circ}\text{C}$),未作低温处理,也获得了较理想的分裂相。

3.3 低渗 蜗牛性腺外,被一层粘液物质包围,似形成一层保护膜,药物很难作用,因此低渗条件的选择就很关键。低渗不足,细胞膜不破裂,难以获得染色体分裂相;低渗过长,细胞膜破裂,染色体分散过度,造成丢失。实验中采用室温(20—25 $^{\circ}\text{C}$)、30 $^{\circ}\text{C}$ 及37 $^{\circ}\text{C}$ 的浓度为0.037mol/L的KCl溶液,低渗处理时间分别为1小时、2小时和4—6小时,分成9组实验,最后确定:30 $^{\circ}\text{C}$ 温浴4—6小时,得到的分裂相最多。

3.4 固定 固定是保持染色体完好形态和利

于染色的关键步骤,使染色体核蛋白保持原有结构,使染色体更接近活体状态。常选用的固定液为甲醇、冰醋酸。甲醇使蛋白质凝固,组织收缩;冰醋酸则渗透能力强,能固定核蛋白,易使组织膨胀,二者混合能起到拮抗作用。常规采用的是甲醇:冰醋酸为3:1的现配溶液。由于蜗牛粘液的存在,不利于药品渗入,使染色体分散较困难。于是我们采用甲醇:冰醋酸为1:1,2:1,3:1的梯度固定,每次固定10分钟,以促进染色体分散,效果较好。

3.5 滴片 载玻片一定要洗得很干净,滴片前作预冷处理,使所用载玻片表面有层薄冰。

滴片时让细胞悬浮液从20cm左右落下,凭借重力作用,散开染色体。然后迅速在火焰上过几下,因载玻片上有层薄冰,遇热融化、散开、带动染色体,使染色体充分展开,获得较好的染色体形态。

因此,染色体制备方法学上的突破和改进,是染色体研究的关键,它使获得陆生软体动物大量染色体数据资料,并将这些资料应用于陆生软体动物系统学研究成为可能。

致谢 本实验得到北京师范大学生物系刘凌云教授的指教,中国科学院动物研究所陈德牛先生提供了实验材料,深表谢意。

参 考 文 献

- 1 Inaba, A. Cytological Studies in Molluscs II. A chromosome survey in the Stylommatophoric Pulmonata. *Journal of Science of the Hiroshima University*. 1959, 18(8): 1—23.
- 2 ——— Chromosome and Phylogeny of Mollusca. *Japanese Society of Systematic Zoology*. 1979, 52: 1—7.
- 3 Patterson, C. M. A Karyotype technique using freshwater snail embryos. *Malacological Review*. 1971, 4 (1): 27.
- 4 Tatewaki, R. and J. Kitada. Karyological studies of five species of land snails (Helicoidea: Mollusca). *Genetica* 1987, 74: 73—80.
- 5 王先志,王桂云,马庆惠等. 峨螺科的三种螺的核型观察. *动物学研究*, 1990, 11(3): 259—263.
- 6 石安静. 我国几种淡水珍珠蚌染色体的研究. *四川大学学报(自然科学版)*, 1980, 4: 169—175.

(下转第64页)