

青岛文昌鱼(*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) 染色体 G 类带型研究*

牟洪善^{1,2} 王昌留¹ 李金萍³

(1. 鲁东大学生命科学学院 烟台 264025; 2. 东华理工大学学团部 南昌 330013;
3. 东华理工大学信息工程学院 南昌 330013)

摘要 以青岛文昌鱼的晚期囊胚和早期原肠胚的胚胎细胞为实验材料, 利用低渗处理、空气干燥法制备染色体玻片标本。在此基础上, 为进一步探索显示青岛文昌鱼染色体 G 带的新方法, 采用片龄、蛋白酶 K 和胰蛋白酶显带技术对青岛文昌鱼的染色体进行了初步研究, 显示了青岛文昌鱼染色体的 G 类带型, 绘制了青岛文昌鱼染色体的 G 类带型模式图, 并对三种 G 类带型作了比较, 进而提出了文昌鱼染色体的 G 带带型与片龄的相互关系。

关键词 青岛文昌鱼, 染色体带型, G 带, 片龄
中图分类号 Q23

文昌鱼(*Branchiostoma*)产生于五亿年前, 在我国的沿海地区均有分布, 最为人们熟知的是厦门和青岛两地的文昌鱼, 为我国二级保护动物(陈锦等, 2009)。关于文昌鱼染色体的报道始于 100 多年前, 但文昌鱼细胞遗传学研究仍不尽人意, 有关染色体的报道寥寥无几。迄今只有几种文昌鱼 *Branchiostoma lanceolatum*、*B. floridae*、*B. belcheri*、*B. japonicum* 有过染色体数目的报道且结果尚不一致(Colombera, 1974; Howell *et al*, 1971; Nogusa, 1957; Saotome *et al*, 2001; Wang *et al*, 2003; 张秋金等, 2009)。

本实验对 Wang 等(1972)及 Zhang 等(2004)的方法进行改良, 研究了胰蛋白酶 G 显带技术, 并且首次应用蛋白酶 K 和片龄显带技术对青岛文昌鱼染色体 G 带进行研究, 获得了青岛文昌鱼的染色体 G 带, 此法有操作简便, 节约经费等优点, 旨在进一步探索青岛文昌鱼染色体显带的新方法, 为文昌鱼染色体带型的进一步研究奠定了基础, 进而比较各种物种间染色体的演化, 阐明各个物种在进化过程中的关系, 为物种分类和系统演化研究提供细胞遗传学方面的

直接证据。

1 材料与方法

1.1 材料

青岛文昌鱼(*Branchiostoma belcheri tsingtauense*)胚胎细胞。

试剂为 40 μ g/ml 秋水仙素, 0.075mol/L KCl, Carnoy's 固定液(甲醇 冰醋酸 = 3 1), Giemsa 原液, 0.067mol/L 磷酸盐缓冲液, 0.85% NaCl 溶液, 0.02% EDTA-Na₂ (乙二胺四乙酸钠), 5% NaHCO₃ 溶液, 0.1% 胰蛋白酶(1 250, 国产)溶液、0.025% 蛋白酶 K 液, 10% Giemsa 染液。

1.2 方法

1.2.1 染色体玻片标本的制备 参照作者青岛文昌鱼染色体制备的方法制备染色体玻片标本(Wang *et al*, 2003, 2004)。

1.2.2 片龄显带步骤

(1) 选室温下分别存放 5 年、2 年、1 年的玻片标本。

* 国家“863”项目资助, 2008AA092604 号, 山东省教育厅项目资助, J08LE03 号, 江西省教育厅项目资助, GJJ11490 号。牟洪善, 硕士, 助教, E-mail: muhongshan@126.com

通讯作者: 王昌留, 博士, 教授, E-mail: changliuwang@sina.com

收稿日期: 2010-03-15, 收修改稿日期: 2010-05-28

(2) 10% Giemsa 染液染色 45min。

(3) 先用自来水细流冲洗标本数秒, 再用蒸馏水冲洗, 晾干镜检, 挑选染色适度、具有染色体中期分裂相的标本用中性树胶封片。

(4) 挑选染色均匀、分散良好的中期染色体相, 用 OlympusDP70 相机进行显微摄影。

1.2.3 蛋白酶 K 显带步骤

(1) 将从超低温冰箱中取出的染色体玻片标本, 空气干燥后, 放在 80 ℃ 烘箱中烘烤 2h, 然后取出, 置于室温冷却。

(2) 把在 4 ℃ 冰箱中保存的终浓度为 0.025% 蛋白酶 K 液滴加到载玻片上, 然后放在 40 ℃ 水浴锅中, 反应 8min。

(3) 用蒸馏水洗净蛋白酶 K, 晾干。

(4) 同上“1.2.2”(2)、(3)、(4)。

1.2.4 胰蛋白酶显带步骤 参照 Wang 等(1972, 2004)的方法稍作修改。

(1) 0.1% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA-Na₂ 按 1:1 混合于立式染缸中, 检查并用 NaHCO₃ 调整至 pH 6.8—7.0, 然后将盛有混合溶液的染缸暂置于冰箱中。

(2) 将在 37 ℃ 温箱中预处理 2—3h 的标本分别浸入胰蛋白酶和 EDTA-Na₂ 的混合液中, 处理 60s。

(3) 经混合液处理过的标本, 在磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 中漂洗数秒。

(4) 同上“1.2.2”(2)、(3)、(4)。

1.3 带型分析

用上述方法处理过的文昌鱼染色体玻片, 能显示出较为清晰的带纹, 每个染色体均有其特定的染色特征, 深染区和浅染区在染色体全长上交替分布。带的染色程度分为 5 个等级, 从深至浅依次是浓染带(深染)、中度浓染带、轻微或较弱的阳性带、淡的阴性带、极淡的阴性带。分别挑选染色体分散良好, 周缘及带纹清晰, 形态完整, 染色体数目正确、长短适中的 10 个中期相, 在 10×100 倍油镜下观察进行显微数码摄影, 利用 Photoshop 图像处理软件进行剪贴、排序。分析比较每对染色体带纹的大小和位置, 并绘制出带型模式图, 以最大限度地概述每一染色体的带型特征。模式图上各号染色体的带型是按照显带染色体各条带的宽窄和位置绘制, 黑色、白色分别代表阳性带、阴性带。带型分析参照人类细胞遗传学命名法的国际体制(ISCN)原则, 并以作者的研究结果为基础, 对每号染色体进行描述(吴醒夫等, 1983)。

2 结果与讨论

2.1 片龄与显带

2.1.1 结果 选用置于常温下存放 5 年、2 年、1 年的良好染色体玻片标本, 不用酶液处理, 而直接染色, 结果发现 5 年片龄的染色体显示出的带纹最明显, 即文昌鱼染色体显带与片龄有一定的关系, 即片龄越长, 显带越明显。对 5 年片龄的染色体的带纹进行带型分析, 得出模式图(图 1), 有关各条染色体的带纹描述见表 1。

2.1.2 讨论 染色体的化学成分是核酸和蛋白质, 染色体玻片标本经长时间的暴露在空气中造成蛋白质老化分解, 而使 DNA 分子中碱基暴露。片龄越长, 蛋白质的分解越彻底, 碱基对暴露的也就越充分, 从而造成显带越明显。但是, “老化”是一个非常广义的概念, 究竟染色体在老化期间发生了怎么样的本质变化, 老化多长时间对染色体既无损伤又能显示出精细的带纹, 尚须进一步研究探讨。

2.2 蛋白酶 K 显带

2.2.1 结果 用 0.025% 蛋白酶 K 处理染色体经 Giemsa 染色后, 其染色体模式图如图 2 所示, 带纹描述见表 2。

2.2.2 讨论 蛋白酶 K 是一种非特异性丝氨酸蛋白酶, 具有很高的比活性, EDTA 等螯合剂或 SDS 等去垢剂不能使其失活。同时, 具有反应范围广、活性高的特点, 在缓冲液 pH 4—12.5 和温度 37—60℃ 范围内都有活性。在显带过程中有两个重要的环节: 一是蛋白酶消化环节, 消化不足带不出现, 消化过度染色体变得膨胀和不着色, 因此, 必须把握好蛋白酶浓度、消化时间和消化温度; 二是预处理或老化环节, 对消化和带纹清晰度有很大影响, 经探索发现, 其中 80℃ 热处理 2h, 是简便易行和效果较好的办法。

2.3 胰蛋白酶显带

2.3.1 结果 青岛文昌鱼经 0.1% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA-Na₂ 处理后染色体显带的模式图见图 3, 每条染色体的特征见表 3。

2.3.2 讨论 染色体经酶处理后, 因蛋白质已被水解而使 DNA 分子中碱基暴露。由于碱基中 G/C 和 A/T 组合的比例不同, 对染料结合的程度不同, 如果这段 A/T 碱基成分多, 则 Giemsa 染料易与其结合, 被深染; 若 G/C 碱基成分多, 则 Giemsa 染料不易与其结合, 结果呈淡染(Chuprevich, 1973)。即在 G 带深染区富含 A-T 碱基对, 而 G 带浅染区富含 G-C 碱基

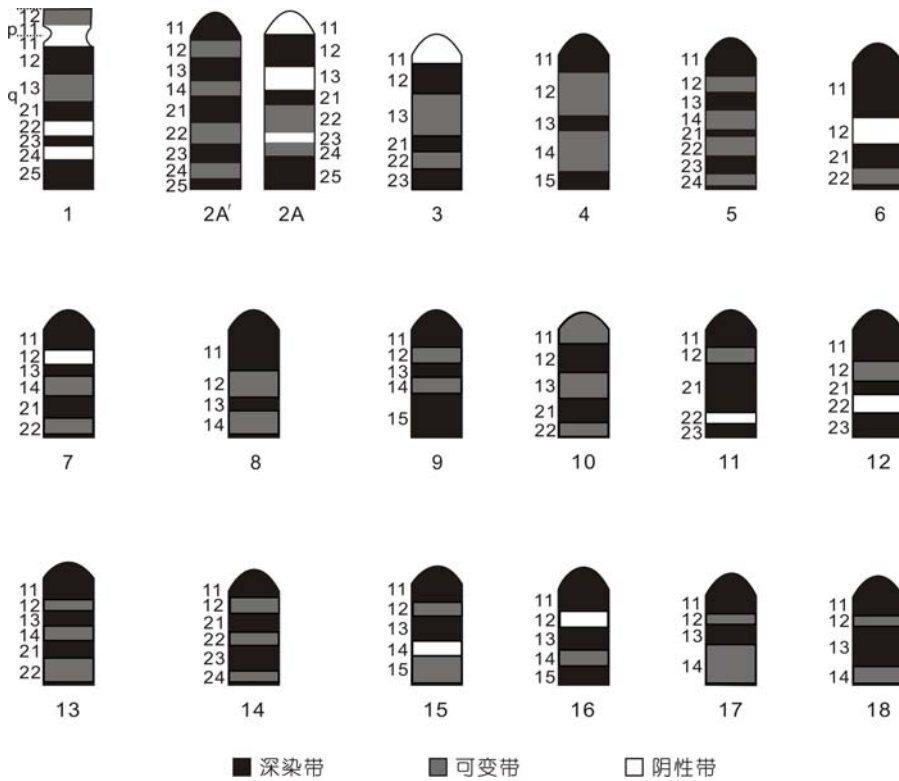


图 1 青岛文昌鱼 G 带模式图(片龄)

Fig.1 Ideograms of G-banded chromosomal patterns of amphioxus *B. belcheri tsingtauense* (slide aging)

表 1 青岛文昌鱼 G 带带纹特征(片龄)

Tab.1 The features of G-banded patterns of amphioxus *B. belcheri tsingtauense* (slide aging)

染色体号	臂	区数	条	典型特征
1	p	1	2	整条短臂着色较浅
1	q	2	8	近着丝粒处和末端是较大的且大小相等的阳性带(q12)和(q25)
2A'	q	2	9	整条染色体阳性带和可变带交替均匀分布
2A	q	2	8	末端是较大的阳性带, 整条染色体含有 3 条阴性带
3	q	2	6	着丝粒处为较大且极淡的阴性带, 中部是大的可变带(q13)
4	q	1	5	着丝粒处着色极深, 中部 2 条大的且大小相近的可变带
5	q	2	8	整条染色体除中部的阳性带(q21)极窄外, 其它带大小都相近
6	q	2	4	着丝粒处有一极大的深染带(q11), 中部有一较宽的阴性带(q12)
7	q	2	6	着丝粒处是较大且浓染的阳性带(q11)
8	q	1	4	着丝粒处有一极大的深染带(q11)
9	q	1	5	染色体端部的阳性带(q15)较大且染色深
10	q	2	5	从着丝粒处到染色体中部间隔排列着 2 条大小相近的可变带(q11, q13)
11	q	2	5	染色体的中部是极大且染色深的 q21 带
12	q	2	5	着丝粒处是较大的阳性带(q11)
13	q	2	6	着丝粒处的阳性带(q11)和端部的可变带(q22)大小相等
14	q	2	6	中部的阳性带(q21, q23)较大
15	q	1	5	着丝粒处和端部是相近大小的阳性带(q11)和可变带(q15)
16	q	1	5	5 条带几乎大小相近
17	q	1	4	端部是极大的可变带(q14)
18	q	1	4	中部是极大的深染带(q13)

对(杨慧一, 1991)。由于同源染色体的带纹一致, 可通过带纹对染色体进行较为准确的配对。

由于不同动物细胞在染色体 G 带制备中对胰蛋白酶处理条件有不同的要求, 这与选择合适的胰酶浓度和处理条件有关。Comings (1978)在述及显带机制问题时指出: 在染色体显带技术中, 掌握好处理溶液的有效浓度和安全浓度, 对取得良好的显带非常关键。在本实验中使染色体标本在 EDTA- Na₂ 和胰蛋白酶中处理, 这种方法的优越性在于能控制胰蛋白酶的浓度和处理时间。如果蛋白酶消化不足, 带纹不出现; 同样, 消化过度, 染色体变得膨胀变形, 染色体变淡, 观察不到清楚的带纹, 且无法进行精细带纹数目统计。因此, 必须把握好

蛋白酶浓度、消化时间和消化温度, 在实验中分别选用 0.1% 的胰酶和 0.02% 的 EDTA-Na₂ 的混合液作用 60s; 0.025% 蛋白酶 K 作用 8min, 效果较好。同时, 染色时间过短或过长也将影响实验效果, 经过摸索, 发现选用 10% Giemsa 染色 45min 效果较好。

另外, 染色体的长短, 在染色体带纹结果的分析中也起着重要作用, 不同时期的染色体长度不尽相同, 带的数目也不完全一致。晚前期染色体的带纹数多于早中期染色体的带纹数, 而早中期染色体的带纹数又多于中期染色体带纹数。这是因为随着染色体长度的缩短, 晚前期或早中期染色体上的若干邻近窄带又融合成中期染色体的一些宽带。由此可以看出, 获得较长的

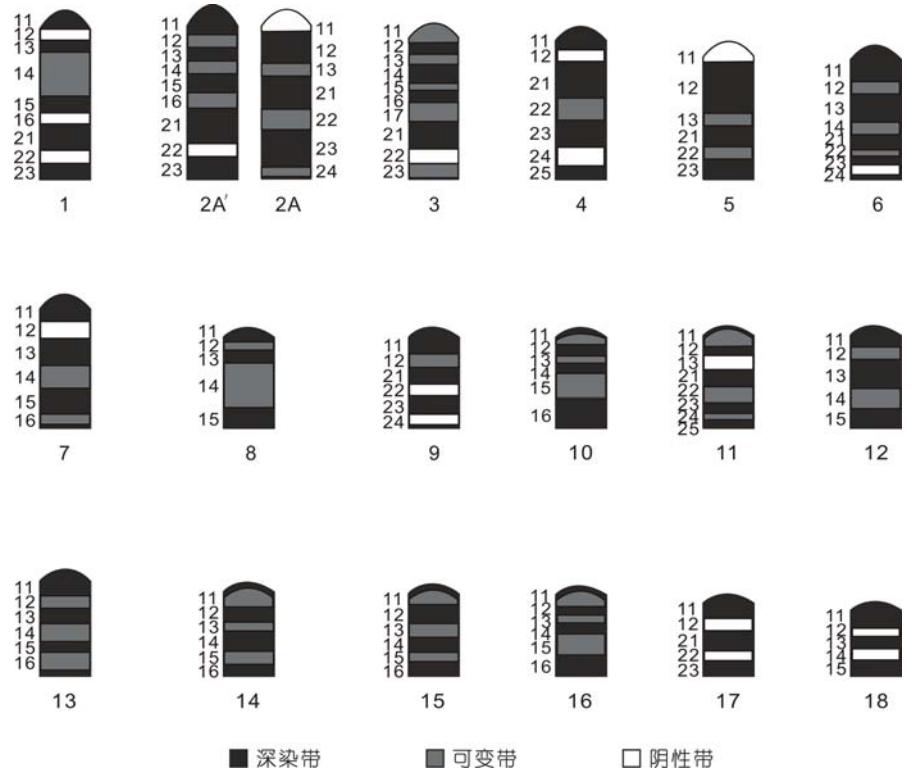


图 2 青岛文昌鱼 G 带模式图(蛋白酶 K)

Fig.2 Ideograms of G-banded chromosomal patterns of amphioxus *B. belcheri tsingtauense* (protease K)

表 2 青岛文昌鱼 G 带带纹特征(蛋白酶 K)

Tab.2 The features of G-banded patterns of amphioxus *B. belcheri tsingtauense* (protease K)

染色体号	臂	区数	条	典型特征
1	q	2	9	中部是大的可变带(q14)
2A'	q	2	9	2 区有一较大的阳性带(q21)
2A	q	2	7	3 条阳性带(q12、q21、q23)几乎大小相近
3	q	2	10	近末端的阴性带(q22)和末端的可变带(q23)有时融合成染色浅的带
4	q	2	7	中部有两条大小相近的阳性带(q21、q23)
5	q	2	6	近着丝粒端是大的阳性带(q12)
6	q	2	8	染色体末端是较明显的阴性带(q24)
7	q	1	6	中部有两条大小相近的阳性带(q13、q15)
8	q	1	5	中部是极大的可变带(q14)
9	q	2	6	着丝粒处和远侧段是两大小相近的阳性带(q11、q23)
10	q	1	6	末端是较大的阳性带(q16)
11	q	2	8	整条染色体的阳性带纹较窄
12	q	1	5	中部阳性带(q13)相对较大
13	q	1	6	3 条阳性带(q11、q13、q15)从着丝粒到中部逐渐变窄
14	q	1	6	着丝粒处是较大的可变带(q11)
15	q	1	6	3 条阳性带(q12、q14、q16)大小相近
16	q	1	6	3 条阳性带(q12、q14、q16)从近着丝粒处到末端逐渐变宽
17	q	2	5	3 条阳性带(q11、q21、q23)大小相近
18	q	1	5	着丝粒处和末端的阳性带大小相近

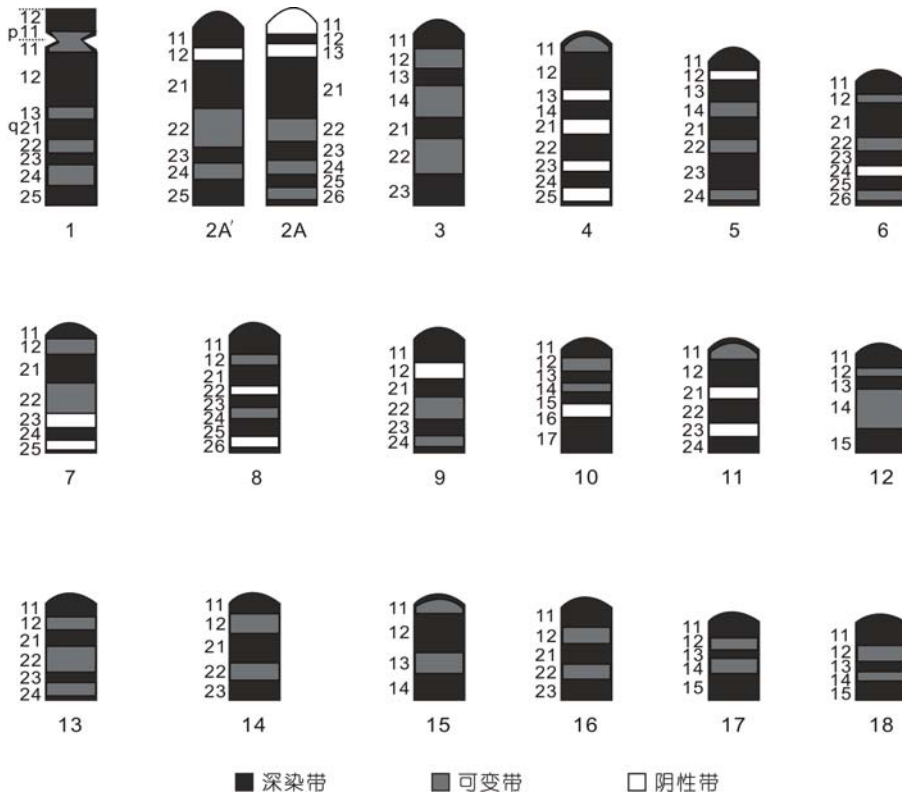


图 3 青岛文昌鱼 G 带模式图(胰蛋白酶)

Fig.3 Ideograms of G-banded chromosomal patterns of amphioxus *B. belcheri tsingtauense* (trypsin)

染色体是提高其分辨率的主要途径(高丽君等, 2006)。因此, 为了便于 G 带带纹数目统计与分析, 就需要控制好秋水仙素的处理时间, 以获得染色体较长的中期相。

2.4 三种方法显示的带纹比较
根据青岛文昌鱼 G-带带型分析, 每号染色体都有其特定的带型。通过分析比较可以看出, 三种方法所显示出的带纹特征既有相同点, 又有不同点。

相同点: 2A'、6、7、8、9、12、13、17、18 号染色体的着丝粒处皆为阳性带; 1、2A'、11、12、16 号染色体的末端都是阳性带; 2A 染色体的着丝粒处都为较大的阴性带; 13 号染色体的整体带纹相似。另外, 三种方法显示的结果每两种之间也有许多共同点, 例如, 用胰酶法和蛋白酶 K 法显示的 6 号染色体

表 3 青岛文昌鱼 G 带带纹特征(胰蛋白酶)

Tab.3 The features of G-banded patterns of amphioxus *B. belcheri tsingtauense*

染色体号	臂	区数	条	典型特征
1	p	1	2	短臂末端是 1 个浓染带(p12)
1	q	2	8	近着丝粒处是着色极深而宽的阳性带(q21)
2A'	q	2	7	中部是大小相等的较大的阳性带(q21)和可变带(q22)
2A	q	2	9	着丝粒处是染色极浅的隐性带(q11), 中部是较大的阳性带(q21)
3	q	2	7	从着丝粒到末端依次间隔排列着逐渐变宽的 3 条可变带和 3 条阳性带
4	q	2	9	近着丝粒端是较大且浓染的阳性带(q12)
5	q	2	8	近末端是较宽的阳性带(q23)
6	q	2	8	中部是较宽且着色很深的浓染带(q21)
7	q	2	7	中部的阳性带(q21)和可变带(q22)大小相等
8	q	2	8	着丝粒处是较大且染色深的 q11 带
9	q	2	6	着丝粒处是较大且染色深的 q11 带
10	q	1	7	端部是一较大的阳性带(q17)
11	q	2	6	两大小相近的阴性带(q21, q23)分别位于中部和近端部呈对称排列
12	q	1	5	中部有大的可变带(q14)
13	q	2	6	从着丝粒到近末端依次是 3 条逐渐变窄的阳性带
14	q	2	5	中部阳性带(q21)较宽
15	q	1	4	近着丝粒处是较宽的阳性带(q12)
16	q	2	5	大小相近的 3 条阳性带和 2 条可变带间隔排列
17	q	1	5	染色体的两端是大小相近的阳性带
18	q	1	5	着丝处是较大的阳性带

带型相似;用蛋白酶 K 和片龄所显示的 7 号染色体的末端都是可变带等。

不同点: (1) 带纹数目不同。胰蛋白酶法共显示了 125 条带, 其中阳性带为 66 条, 阴性带为 17 条, 可变带为 42 条; 蛋白酶 K 法共显示了 125 条带, 阳性带为 65 条, 阴性带 17 条, 可变带为 43 条; 片龄法共显示了 109 条带, 其中阳性带为 55 条, 阴性带 12 条, 可变带为 42 条。(2) 深染带和浅染带的宽度上也有差异。例如, 胰蛋白酶法显示的 1 号染色体的长臂近着丝粒处、2A 染色体中部、15 号染色体中部和片龄显带法所显示的 6 号染色体着丝粒处, 都有一极宽的深染带; 片龄显带法所显示的 3 号染色体、2A 染色体着丝粒处是宽的浅染带等。另外, 不同细胞中同一染色体个别带纹的染色强度也不完全一致, 这可能与标本质量或胰酶作用时间不同有关。

三种方法显示的 G 带带纹的差异, 可能主要由于不同的显带处理方法, 对染色体的 DNA 和蛋白质在处理过程中丢失的程度不同造成的。若染色体上所含的蛋白质因消化或老化得较为彻底, 染色体上富含 A-T 的染色体区段暴露得就更充分些, 便于与 Giemsa 染液结合, 加强了染色体上原有的结构——带纹的显示。

参 考 文 献

- 杨慧一, 1991. 草鱼和团头鲂染色体 G 带带型的研究. 动物学报, 37(4): 431—437
- 吴醒夫, 陈宜峰, 徐 芸等, 1983. 人类染色体命名国际标准
- 化. 云南: 云南人民出版社, 107—130
- 陈 锦, 黎中宝, 赵斌丽等, 2009. 厦门文昌鱼(*Branchiostoma belcheri* Gray)种群杂合性研究. 海洋与湖沼, 40(1): 78—82
- 高丽君, 宋 芳, 2006. 不同来源胰蛋白酶对染色体 G 显带的影响. 包头医学院学报, 22(1): 77
- Chuprevich T W, 1973. Mechanism of trypsin chromosome banding. *Lancet*, 1: 484
- Colombera D, 1974. Male chromosomes in two populations of *Branchiostoma laceratum*. *Experientia*, 30(4): 353—355
- Comings D E, 1978. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann Rev Genet*, 12: 25—46
- Howell W M, Boschung H T, 1971. Chromosomes of the lancelet. *Branchiostoma floridae* (order Amphioxii). *Experientia*, 27(12): 1495—1496
- Nogusa S, 1957. The chromosomes of the Japanese lancelet, *Branchiostoma belcheri* (Gray), with special reference to the sex-chromosomes. *Annotatones Zoologicae Japonenses*, 30: 42—47
- Wang C L, Zhang S C, Chu J S, 2004. C-banding pattern and nuclear organizer regions of amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense* Tchang et Koo, 1936. *Genetica*, 121: 101—105
- Wang C L, Zhang S C, Zhang Y Z, 2003. The karyotype of amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83: 189—191
- Wang H C, Fedoroff S, 1972. Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nature: New Biology*, 235: 52—53
- Zhang S C, Wang C L, Chu J S, 2004. G-banding patterns of the chromosomes of amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. *Hereditas*, 141: 2—7

STUDIES ON THE G-TYPE CHROMOSOMAL PATTERNS OF AMPHIOXUS *BRANCHIOSTOMA BELCHERI TSINGTAUENSE*

MU Hong-Shan^{1,2}, WANG Chang-Liu¹, LI Jin-Ping³

(1. College of Life Sciences, Ludong University, Yantai, 264025; 2. Students' Affairs Office, East China Institute of Technology, Nanchang, 330013; 3. College of Information Engineering, East China Institute of Technology, Nanchang, 330013)

Abstract The chromosomal patterns of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) were studied using blastula and early gastrula stages of embryos underwent hypotonic treatment and air-drying. New techniques for G-type banding were investigated using trypsin, protease K, and slide aging treatment. The G-type bandings of amphioxus were obtained and the chromosomal profiles were shown. The characteristics of the three G-type bands were compared, the similarities and differences were discussed. In addition, the correlation between the slide aging and G-banding was proposed.

Key words Amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*, Chromosome banding, G-banding, Slide aging