

小鼠成纤维细胞早中期染色体标本 制备及 G 带核型分析

王一平 程在玉

(中国协和医科大学,北京)

目前,由于染色体病、肿瘤及基因定位研究的精确度的提高,不仅要求识别染色体,而且需要明确其精细的带型结构。本工作介绍一种小鼠成纤维细胞经体外培养获得早中期 G 带染色体的方法,所得带型与目前国际普遍采用的 Nesbitt 及 Franke 标准模式图一致,单倍体带纹达 300 条。本工作特点在于方法简便、稳定,带纹清晰,且可用于慢性动物实验。

关键词: 小鼠成纤维细胞,同源基因连锁群, G 带型

制备小鼠中期染色体,可采用外周血淋巴细胞培养的方法,但这种方法的缺点是,(1)血量少且易凝集;(2)常需分离血浆以减少对细胞的生长抑制。本研究利用小鼠成纤维细胞短期培养方法,收获前用低浓度秋水仙胺处理,可获得大量中期及较多的早中期分裂相。用 GIG 显带法所得 G 带型^[8,9],单倍体带纹数达 300 条左右,从而为基因定位及高分辨 G 带型等研究打下了基础。

材料和方 法

(一) 动物及试剂 实验动物为昆明及 ICR 小鼠品系。培养基为 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO 产品)。培养液含胎牛血清 20%,青链霉素分别为 100 μ /ml 及 100 μ g/ml, L-谷氨酰胺 2mM,用碳酸氢钠调 pH 至 7.0—7.2。胶原酶 (Collagenase, Type I, Sigma 产品),用不含血清的 Eagle 或 L-15 培养基配制 1 mg/ml 溶液,抽滤除菌后,分装置 -20°C 保存备用。

(二) 细胞培养 采用以下两种方法:第一,尾组织经胶原酶消化后培养法^[2]。将小鼠放置固定器内,露出尾部,用 70% 酒精棉球消

毒尾末端 2—3 厘米,刀片轻轻刮去毛,勿伤皮肤。以下步骤均无菌操作,先切下鼠尾约 1 厘米,置已有 1—2 滴培养液的平皿内,经 70% 酒精短暂消毒 2—3 次,移入另一盛有 1—2 滴培养基的平皿内。然后剪切成碎块,用吸管移入一装有小磁球的瓶内,加入胶原酶溶液 5 ml。室温下搅拌 40—60 分钟后,将细胞悬液移入离心管中,1000 转/分钟离心 7—8 分钟,弃上清液,加培养液 3—5 毫升,混匀,将细胞悬液移入培养瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中静置 4—5 天。观察,换液。根据细胞生长情况,可原代收获或传代。第二,尾细胞碎块培养法。小鼠固定、尾部消毒、去毛,切下尾末端部等步骤同前方法。将组织剪碎成糊样,用弯头吸管将组织移入培养瓶,使其贴附于瓶壁上,向瓶底加培养液 3 毫升,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中约 30 分钟后,将培养瓶翻转令培养液浸盖尾组织,静置 4—5 天。

采用上述两种方法,均能获得良好的结果。一般第一种方法在换液后 24 小时,或第二种方

Wang Yiping et al.: The Methods of Preparing Early Metaphase Chromosomes and the Study on Their G-banding Patterns in Mouse Fibroblasts

本文于 1987 年 8 月 21 日收到。

法传代后,48 小时细胞达生长旺盛期,在倒置显微镜下观察确定细胞收获时机。收获前 1 小时加入秋水仙胺使浓度为 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 常规制备染色体标本。

GTG 显带基本步骤按 Seabright 的方法^[10]。片龄 3—5 天的标本置 60—70℃ 的烤箱处理 1—2 小时,于 37℃ 0.0025% 胰酶 (Difco 产品) 生理盐水溶液内消化 1.5—2 分钟,生理盐水漂洗,5% Giemsa 磷酸盐缓冲液染色约 8 分钟。在 Olympus Brl-2 型显微镜下观察并摄影,胶片为 Kodak 2415 型。

结 果

小鼠核型由 $2n = 40$ 条端着丝粒染色体组成。性染色体雄性为 XY, 雌性为 XX。核型排列参照国际小鼠标准核型^[3], 而 G 带核型则按 Nesbitt 及 Frank 建议的目前国际上普遍采用的《小鼠染色体带型命名系统》^[8,9] 及模式图进行对照分析。本工作所得 G 带核型与模式图的比较见图版 I, A、图版 II。某些染色体具有相似的带型^[4], 在鉴别上有一定困难, 列出以资比较, 见图版 I, B。19 对常染色体及性染色体带型特征及某些相似的染色体的比较描述如下。

1 号染色体 是最长的一对染色体, 1D 区将染色体分为上下两部, 上部为较窄的 1A 和较宽的 1C 区。1A3 及 1A5 位于着丝粒下方, 1C 区有三条不连续带即 1C1、1C3 及 1C5。下部有两界标即 1E1/2 及 1G, 1H 区可见 1H2、1H4 及 1H6 三条带。1 号与 X 染色体大小形态相似, 其主要区别是 1E1/2 与 1G 之间有 1E4, 而 X 染色体的 XC 与 XE 之间无与 1E4 相对应的带。1A3/5 对鉴别也有用。1 号与 6 号染色体也有相似处, 对比见图版 I, B(带型相似的染色体对比均参看图版 II, 下同)。

2 号染色体 浅染的 2B 区将 2A 区与其他区分开, 是重要的形态特征。2B 下方有三条明显的带即 2C1、2C3 和 2E1。2G 为远端明显深带, 其下方有 2H2 及 2H4 两条暗带。

3 号染色体 3 号与 10 号相似, 其鉴别要点是, 3 号较长, 3A3、3C 及 3E 位于染色

体上 1/2, 3A3 紧靠着丝粒下方; 10 号的 10B1、10B2 及 10B3 位于染色体中上部, 10B1 距着丝粒较远。此外, 3G 下方有 3H2 及 3H4, 而 10D1 距末端较近, 其下方仅有 10D3。

4 号染色体 主要界标为紧密分布的一组带 4C1—4C7, 其中以 C3 最为明显, 4D 为浅染区, 4E1 为最远端深带, 是识别 4 号染色体的重要标志。

5 号染色体 主要两组带 5C 及 5E 位于染色体中部 1/3 处, 其上的 5B 区及其 F 的 5F 区均为浅带, 5G1 及 5G3 为末端的两暗带。4 号、5 号和 7 号染色体有相似处, 应注意鉴别。

6 号染色体 位于中部的 6C 区是染色体的特征, 其上部有深带 6A3 及暗带 6B2。深染的 6E 为一界标, 6G 为一较深染的区, 由 6G1 和 6G3 构成。

7 号染色体 位于中部深染的 7C 及 7E1 是界标, 其间的细带 7D2 是与 5 号染色体区别的标志之一。着丝粒下方及 7C 区之间可见 7A3、7B2 及 7B4。7F2 及 7F4 为远端两暗带。

8 号染色体 主要深带 8B3 位于染色体中部, 其上方为暗带 8A3 和 8B1。深带 8D1 常与 8D2 融合, 它们与 8B3 之间可见细带 8C2。

9 号染色体 位于近末端的深带 9E3 为主要特征, 常与 9E1 及 9E4 融合, 中部浅染的 9B 及 9D 间为暗带 9C。9 号与 13 号相似, 但 13 号带纹数目较少, 且中部没有与 9C 相对应的带。

10 号染色体 着丝粒下方均匀排列的三条深带 10B1、10B2 及 10B5 以及近末端深带 10D1 均为此染色体的特征。10 号与 14 号相似, 应注意鉴别。

11 号染色体 紧靠着丝粒下方的两深带 11A3 及 11A5 为主要特征。远侧 2/3 淡染, 远端 11C 及 11E1 较明显。

12 号染色体 位于中部的两主要深带 12C1 和 12C3 及较宽且浅染的 12B 区为其主要特征。

13 号染色体 中部浅染 B 区将其分为

上下两部,上部有两暗带 13A3 及 13A5,下部 13C3 最明显。注意与 9 号区别。

14 号染色体 14A3 下方为浅染的 14B 区,二组深带分别位于 14C 区和 14E 区。

15 号染色体 远侧 1/3 浅染的 15E 区及末端带 15F 为主要特征,近侧 2/3 大致均匀分布三条带,即 15B3、15D1 及 15D3。

16 号染色体 占整个染色体长度 1/3—1/2 的深染的 16C 区为主要特征,16B2 及 16B4 淡染位于中部以上。

17 号染色体 位于着丝粒下方的 17A3 可作为界标,与 18 号染色体区别。17C 位于中部,17E1、17E3 及 17E5 位于下部。

18 号染色体 中部深染的 18B3 及 18D 区是主要特征,根据 18B1、18E2 和 18E4 可与 19 号鉴别。

19 号染色体 是最小的常染色体,19B 浅宽且只有三条暗带,即 19C1、19C3 及 19D2。

X 染色体 主要特征是远侧 1/2 有深染的 XC 区及 XE 区,末端可见暗带 XF2 及 XF4。近侧 1/2 有 XA3、XA5 及 XA7 三条暗带。X 染色体与 1 号相似。

Y 染色体 无深染的着丝粒,整个染色体暗染,位于中部的 YC1 和 YC3 及两端的 YA2 和 YE 均不明显,但 Y 染色体易与其他染色体区别。

讨 论

实验动物小鼠,特别是不同类型的小鼠动物模型,在基因定位、遗传病、肿瘤及比较遗传学的研究中均具有重要理论及实际意义^[1,5,6,11]。已有研究表明,哺乳类在进化过程中保留了某些同源基因连锁群(homologous syntenic groups)。人与小鼠虽非同一种属,但同样保留了这样的基因连锁群,而且这些相应部位的染色体形态及基因功能均相同^[6,11]。因此,研究小鼠早中期染色体的稳定的制备方法及其精细的带型,具有较大的意义。

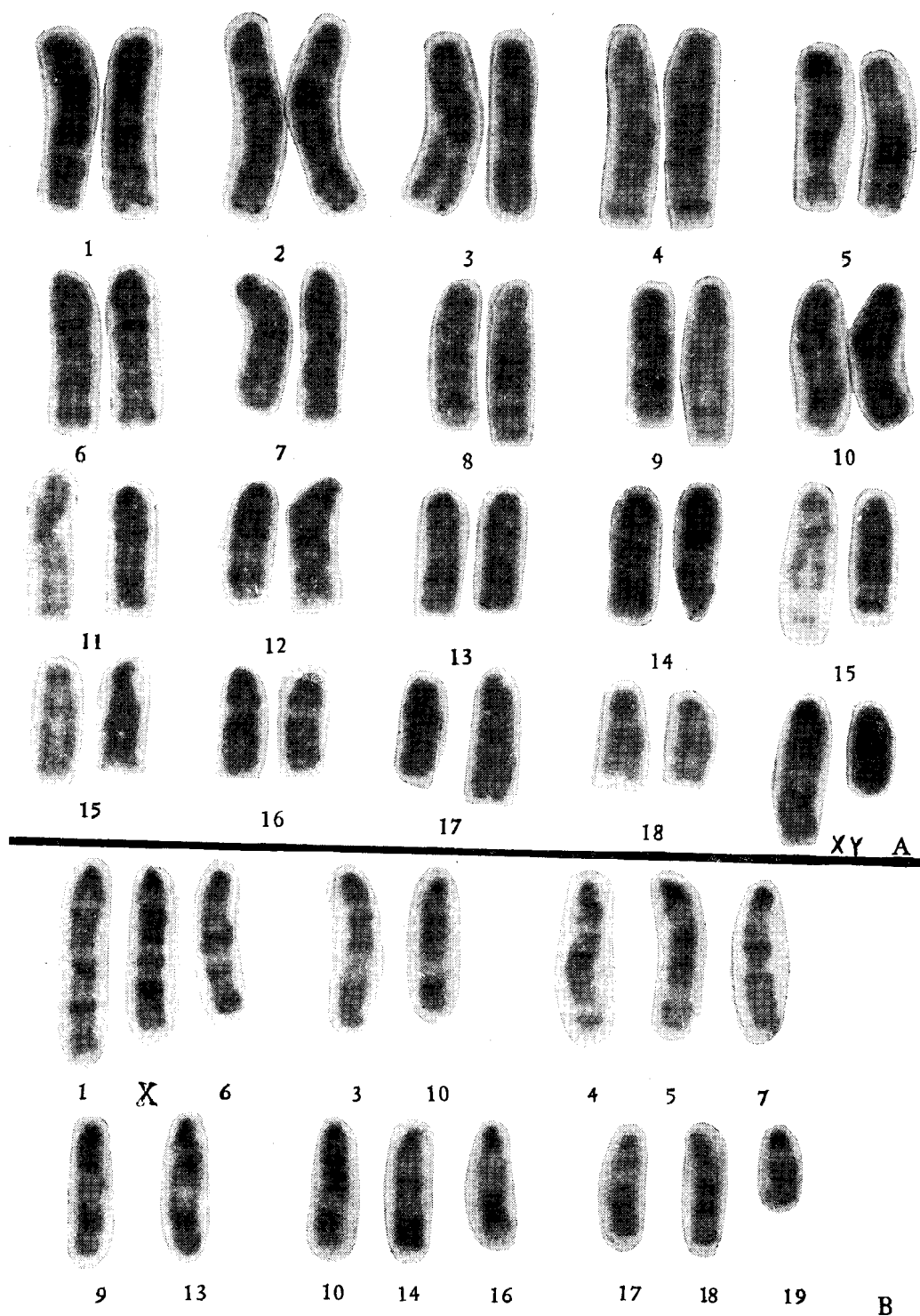
制备小鼠染色体一般采用外周血淋巴细胞培养方法,但有一定的缺点。我们利用小鼠尾

组织成纤维细胞进行培养,在收获细胞前加少量秋水仙胺短期处理,可以获得较多的分裂相,其中早中期细胞占 28.8%,适于本工作的分析。本法优点还在于细胞可以大量增殖,一只动物可以使用数次,便于慢性实验研究。

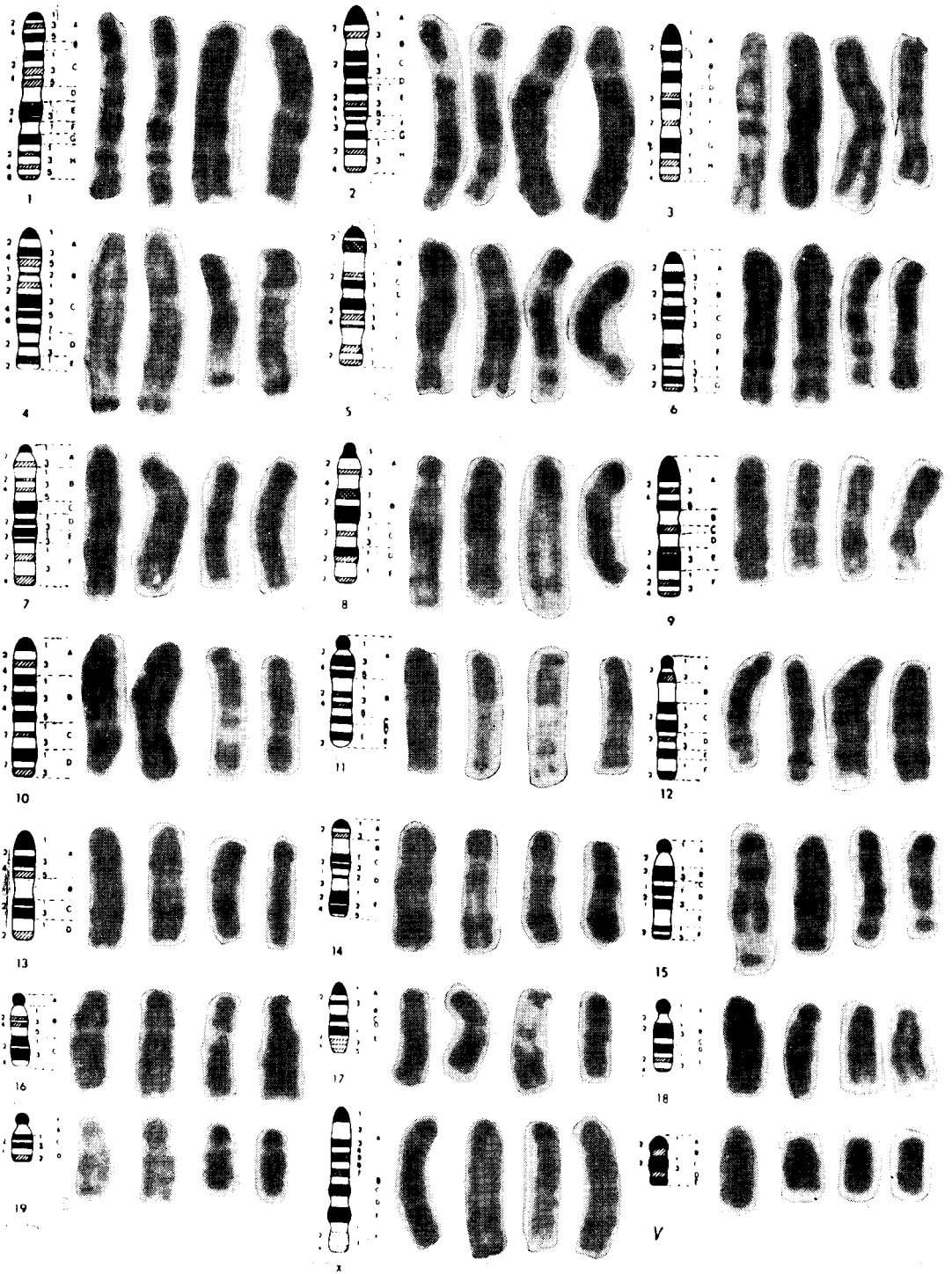
关于小鼠染色体核型国际上早已有公认的标准^[9],但该模式图代表了比较简单的带型,对于研究小鼠染色体的重排已远不能满足需要。Nesbitt 及 Frank 提出的小鼠染色体命名系统^[6,9],其模式图代表了早中期染色体单倍体约 300 条带纹的水平,已为目前国际普遍采用,有的作者在此带型的基础上研究了小鼠染色体高分辨 G 带^[11]。我们在小鼠 α 干扰素基因及 AY 基因定位的工作中应用了这一命名系统及带型图^[2,7]。本工作用昆明及 ICR 两个品系的小鼠为实验对象,所得带纹数达到约 300 条的水平,除个别带纹大小稍有不同外,带型均与 Nesbitt 等所提出的模式图一致。同一核型内有的同源染色体之间大小相差较大,但带型并无不同,这种现象在人类染色体核型中也常见。本工作不仅为稳定地获得早中期染色体及识别其带型提供了方法和资料,而且对小鼠高分辨 G 带、基因的区域定位及染色体重排的研究均有一定意义。

参 考 文 献

- [1] Buckle, V. J. et al.: 1984. *Clin. Genet.*, 26: 1—11.
- [2] Cheng, I. Y. et al.: 1986. *Cytogenet Cell Genet.*, 41: 101—106.
- [3] Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice: Standard karyotype of the Mouse, *Mus musculus*. 1972. *J. Heredity*, 63: 69—72.
- [4] Cowell, J. K.: 1984. *Chromosoma*, 89: 294—320.
- [5] Epstein, C. J.: 1986. *In The Consequences of Chromosome Imbalance, Principle, Mechanism and Models*, Cambridge University Press, London, pp. 311—322.
- [6] Frank, U.: 1983. *In Genetics. New Frontiers, Proceeding of the XV International Congress of Genetics*, New Delhi, pp. 443—452.
- [7] Lovett, M. et al.: 1987. *Genetics*, 115: 747—754.
- [8] Nesbitt, M. N. and U. Frank: 1973. *Chromosoma*, 41: 145—158.
- [9] Nesbitt M. N. and U. Frank: 1981. *In Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, Gustav Fisher Verlag Stuttgart, New York, pp. 317.
- [10] Seabright M.: 1971. *Lancet*, ii: 971—972.
- [11] Sawyer J. R. and J. C. Hozier: 1986. *Science*, 232: 1633—1635.



A. 昆明雄性小鼠 G-带核型(照片较标本放大 2.3×10^3 倍); B. ICR 小鼠具有相似带型的染色体 (照片较标本放大 2.3×10^3 倍)



昆明小鼠早中期染色体 G-带(照片较标本放大 2.3×10^3 倍)；左：G-带型模式图；
右：昆明小鼠早中期染色体 G-带。