

小鼠骨髓细胞有丝分裂染色体标本制备方法的优化

高振华, 吴浩浩, 赵志辉, 许英梅, Aguzey Harry, 程贵兰, 生冉, 许嫣红 (广东海洋大学农学院, 广东湛江 524088)

摘要 将201只小鼠随机分为3组,分别采用1次固定(60 min)、2次固定(30、25 min)和3次固定(30、25和15 min),其他操作步骤相同。结果表明,与1次固定相比,2次固定和3次固定视野中骨髓细胞数量($P < 0.05$)和分裂相细胞数量显著增多($P < 0.05$),制片成功率分别高7.1和7.9个百分点,固定时间分别增加5和30 min。1次固定整体效果不佳,或很难找到明确形态的染色体,或染色体形态不清晰、分散;2次固定染色体分散效果良好,染色体数目和形态都十分清晰,染色体结构完整;3次固定中期分裂相多,染色体集中且分散适度,染色体清楚可见,分布整齐不重。综合考虑,小鼠骨髓细胞有丝分裂染色体标本制备的最佳固定次数为2次,适宜的固定时间为30、25 min。

关键词 小鼠骨髓细胞;染色体制片;固定程序优化

中图分类号 S-01 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)07-0102-02

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.07.032



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Optimization of Preparation Methods for Mitotic Chromosome Specimen of Bone Marrow Cells in Mice

GAO Zhen-hua, WU Hao-hao, ZHAO Zhi-hui et al (College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract A total of 201 mice were randomly divided into 3 groups, which were fixed one time (60 min), two times (30, 25 min) and three times (30, 25, 15 min), and the other procedure were not different. The results showed that, compared with fixing once, the number of bone marrow cells and split phase cell in the vision field of fixing two times and fixing three times significantly increased ($P < 0.05$), the production success rate in the methods of fixing two times and fixing three times increased 7.1 and 7.9 percentage point respectively, and the fixing time in the methods of fixing two times and fixing three times increased 5 and 30 min respectively. As for fixing once, the overall effect was not good, it was difficult to find definite shape of chromosome, or the chromosome shape was dispersed. As for fixing two times, the number and shape of chromosomes were clear, the dispersion effect was good and the structure of chromosomes was complete. As fixing three times, many cells were in metaphase, the chromosome were concentrated and dispersed moderately, and the chromosomes were clear. Considering comprehensively, the best fixing times for the preparation of mitotic chromosomes in mice bone marrow cells was two times, and the suitable fixation time was 30 and 25 min, respectively.

Key words Bone marrow cells of mice; Chromosome specimen; Optimization of fixation procedure

细胞染色体是细胞核中稳定且重要的成分,是生物遗传物质的载体,其数目与形态是研究生物进化、遗传变异、个体发育、疾病预防、病因发生、疾病诊断和治疗等的基础手段^[1-3]。染色体标本的制备是进行染色体核型分析、带型分析和检测遗传学相关疾病的前提^[4-7]。小鼠因其繁殖周期短、产仔数多、成熟早、个体小、易操作、成本低且与人类基因相似度高等特点^[8-10],是人类疾病研究的首选动物模型,骨髓细胞因数量多、取材方便、分裂增殖性强、不需要进行无菌操作和体外培养,方法简捷而成为进行染色体标本制备的理想材料^[11-13],也是各高校用于细胞遗传学教学的首选实验方法。仅从低渗处理步骤开始至染色前,所需要的时间大约140 min,耗时长,从而导致学生实验不好安排,人们也在尝试优化和改进实验方法,以减少实验持续时间,但以前的研究大多集中于取样部位的选取、离心条件改变、低渗溶液浓度改变、固定液浓度改变等^[14-17],固定次数和固定时间对实验时间的影响研究鲜见报道。为此,笔者对制片操作过程中的固定环节进行了适当优化,以缩短操作时间。

1 材料与方

1.1 实验动物 选择4~8周龄小鼠,性别不限。

1.2 器材与试剂

1.2.1 器材。解剖板、解剖剪、大小镊子、吸管、离心管、培养皿、预冷载玻片、酒精灯、擦镜纸、恒温水浴箱、TDL-5型离心机。

1.2.2 试剂。秋水仙素 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2%柠檬酸钠溶液、0.075 mol/L KCl 低渗溶液、甲醇乙酸(3:1)固定液、Giemsa 染液。

1.3 方法

1.3.1 预处理。在预实验的基础上,共选取4~8周龄的健康小鼠201只,公母不限,随机分为3组,分别1次固定38只(60 min)、2次固定123只(30、25 min)和3次固定41只(30、25、15 min),其他操作步骤不变。具体操作步骤按照《动物遗传学实验教程》^[18]进行。

1.3.2 实验程序。①注射秋水仙素:在试验开始前3~4 h给小鼠腹腔注射秋水仙素,注射剂量为每只小鼠注射200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的秋水仙素0.4 mL。②处死小鼠,收集骨髓细胞:采用颈部移位法处死小鼠,后腿中间剪开皮肤和肌肉,从后肢根部取出股骨置于培养皿中,分离去除附在骨上的肌肉。用2%柠檬酸钠清洗干净,剪掉股骨两端股骨头,暴露骨髓腔,用注射器吸取2%的柠檬酸钠5 mL,反复冲洗骨髓腔至股骨变白,将冲洗液置于离心管中离心,去除上清液留沉淀。③低渗处理:在细胞悬液中加入5 mL 0.075 mol/L的KCl溶液6 mL,将细胞吹打1次,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴30 min,中间吹打1次;1 000 r/min离心10 min。④固定:加入3:1的甲醇-冰醋

酸固定液进行固定,具体方法包括 1 次固定(60 min)、2 次固定(30、25 min)和 3 次固定(30、25、15 min)。最后一次固定后离心,弃去上清液,加入 3:1 的甲醇-冰醋酸固定液 2~3 滴(视细胞数量适当增减,大约相当于 5 倍细胞的体积),摇匀制成细胞悬液。⑤滴片:取事先预冷(-20 ℃)的载玻片,迅速从约 30 cm 高处滴加细胞悬液 1~2 滴,轻轻吹散,酒精灯上过火 2~3 次(切勿过热烤干),风干。⑥染色:取风干后的薄片置于玻璃板上,滴满 Gimesa 染液(0.5 mL Gimesa 原液

加入 9.5 mL 0.01 mol/L PBS, pH 6.8)于载玻片上,染色 30 min 后用蒸馏水冲洗,晾干后观察。

1.4 数据处理 数据以平均值±标准差表示, $P < 0.05$ 表示差异显著;采用 Duncan's 多重比较进行显著性分析。

2 结果与分析

对固定环节进行优化,分为 3 种固定方法,具体结果见表 1。

表 1 不同固定方法的效果比较

Table 1 The effect comparison among different fixed methods

固定次数 Fixing times	视野中骨髓细胞数量 Number of bone marrow cells in the field of view//个	染色体中期分裂相细胞数量 Number of chromosome metaphase cells//个	细胞中期分裂相得率 Yield of metaphase cells//%	固定操作环节所用时间 Fixing time min	制片成功率 Success rate of specimen production//%
1	13.35±5.76 b	2.63±1.56 b	19.70	70	75.00
2	23.23±14.47 a	7.14±4.30 a	30.74	75	82.10
3	22.77±13.15 a	7.31±7.52 a	32.19	100	82.90

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different small letters in the same column indicated significant differences ($P < 0.05$)

1 次固定染色体制片成功率为 75.00%,制片效果不佳,染色体不清晰,重叠,排列不整齐,过于分散不集中;2 次固定染色体制片成功率为 82.10%,染色体数目清楚,结构清晰,分散充分而适度,没有叠加;3 次固定染色体制片成功率为 82.90%,染色体长度适中,数目分明,染色体形态可见,整齐排列不叠加。从制片成功率和和染色体标本制备的质量来看,2 次固定和 3 次固定的效果均好于 1 次固定,且 2 次固定和 3 次固定的效果差异不明显($P < 0.05$)。3 种固定方法的视野中骨髓细胞数量差异不显著。染色体中期分裂相细胞数量的变化与视野中骨髓细胞数量相一致,多次固定的效果也显著优于 1 次固定($P < 0.05$)。

3 讨论

小鼠骨髓细胞的染色体制备是细胞遗传学、细胞工程类课程的基本实验方法,用于染色体结构和功能分析及操作,从秋水仙素的注射、骨髓细胞的获取以及低渗处理、固定及滴片的环节都要求精细操作,但固定操作环节耗时最长,一般教材提供的方法大多是 3 次固定,固定时间分别为 30、25 和 15 min,在每次固定后需要离心 10 min,仅固定环节就耗时 100 min。因此,基于 HACCP(危害分析与关键点控制)理论分析,固定次数和固定时间是制约整个实验的关键因素,直接影响实验所用时间的长短,也是实验程序优化的关键环节,因此在多次预实验后确定可行的 3 个固定程序。该研究发现,1 次固定效果不佳,染色体形态模糊不清,染色体易离散不集中,染色体边缘起毛等现象导致观察效果不佳,不适用于染色体核型分析。研究表明,无论是小鼠骨髓细胞、蟾蜍骨髓细胞等动物的同一部位染色体制备,还是小鼠不同部位的细胞,大多采用 2 次固定或 3 次固定。这可能是因为 1 次固定甲醇-冰醋酸固定液未能充分透过细胞膜发挥作用,影响制备效果。经观察发现,采用 2 次固定和 3 次固定时,标本均着丝点位置清晰,染色体明显伸展、不缠绕,排列整齐,形态清楚可见。制备麻雀、鹌鹑骨髓细胞和羊水细胞的

染色体标本^[14-17]等采用了 2 次固定,而用 3 次固定制备小鼠雄性生殖细胞染色体标本^[18]也能获得清晰的染色体样本,说明 2 种固定方法在试验操作中均获得较理想的效果。究其原因,这可能是因为多次固定可使固定液与细胞充分混匀并进入细胞,对染色体起到固定作用,防止染色体蛋白质自溶,并能增强染色体的嗜碱性,使染色体形态清晰,能够很好地分散^[19-22],提高染色体结构的可见度,改善对小鼠骨髓染色体核型分析的观察效果。然而,从操作时间来看,2 次固定用时 75 min,比 3 次固定所需时间(100 min)减少了 25 min,节省了时间,便于课堂的实验安排。从节约时间、提高效率、节省人力等综合因素考虑,制备小鼠骨髓细胞有丝分裂染色体标本的最佳固定方法为 2 次固定。

固定的目的在于尽快使细胞的结构固定于接近存活的状态,以便进行下一步处理,防止细胞内蛋白质分解导致结构变化。冰醋酸渗透力强,固定迅速,可阻止染色体收缩,使染色体结构免于破坏,但易使组织膨胀。甲醇能迅速穿透组织使组织收缩,2 种溶液按一定比例混合,既能保证固定效果,又能保证染色体的铺展。但若固定时间太长,可能会导致细胞破裂、染色体片段的过分膨胀及染色体散失。这也是一次长时间固定的观察中细胞总数和分裂相细胞少的原因。

动物实验程序是一个不断完善的过程,在进行该实验时发现多个步骤尚有待进一步优化与探索。

4 结论

小鼠骨髓细胞有丝分裂染色体标本制片可采用 2 次固定的方法,固定时间分别为 30、25 min。

参考文献

- [1] 丁鸿,邱东萍,陈少雄.植物染色体标本的制备和染色体核型分析研究进展[J].南方农业学报,2012,43(12):1958-1962.
- [2] 邓芳轶,杨玲.大蒜根尖有丝分裂染色体标本的制作[J].云南民族大学学报(自然科学版),2008,17(1):51-54.
- [3] 王强.家蚕染色体的核型模式及 Bmrbp1 的 FISH 研究[D].重庆:西南大学,2006.

分会被烧死,但这种影响的时间非常短。在开展计划烧除过程中,热带雨林由于湿度大,在林下难以开展计划烧除。常绿阔叶林中由于有很多树种是防火性能较好的树种^[13],且这种林下枯枝落叶较少,开展计划烧除的效果也不明显。竹林和草场是开展计划烧除效果最明显的区域,群落内林下大部分物种的地上部位都会被烧死,但地下部位却仍然具有很强的活力,可在短时间内重新萌发,生长出新的植株,因此群落内植物种类的变化不大。

从监测结果来看,低强度用火仅能烧除林下枯枝落叶,并烧死部分林下草本和小灌木,而这些物种又很快能重新萌发,不会造成物种的消失,因此对其造成的影响只是暂时的。但是,由于烧除后造成群落郁闭度减小,林下空间增大,有利于一些群落中原来没有的物种进入,一些长期由于郁闭度过大而难以生长的物种会因生长空间的改变而迅速生长。因此,计划烧除对增加群落生物多样性具有积极的促进作用。

4.2 计划烧除对野生动物栖息地的影响 通过监测发现,禾本科植物和莎草科植物也是野生动物比较喜食的植物之一。在莲花塘区域,由于大量的白茅生长旺盛,容易倒伏,老化的白茅自然更新时间较长,且动物难以取食。在开展计划烧除工作的过程中发现,在2月底烧除的区域,3月中旬新萌发的植株高度达到40 cm以上,且已经大量开花,已有野生动物取食的痕迹。在未烧除区域,5月下旬仍然未见开花,也没有长出新的植株。

通过监测发现,生长在季风常绿阔叶林下的莎草科植物,在计划烧除后很多区域最先长出的是莎草植物,这些植物生长可为野生动物提供鲜嫩的食物。

通过对栖息地的改造,在很大程度上改善了野生动物的栖息环境,对野生动物的保护、促进人与野生动物和谐相处起到了积极的作用。

4.3 计划烧除对附近村寨的影响 自开展野生动物栖息地改造工作以来,保护区内各村寨受到野生动物的为害明显减少。

野生动物栖息改造与生境恢复项目,吸引了大量野生动物到基地,减少了野生动物对农作物的损害,大大减少了群众的经济损失,一定程度上为周边村寨减轻了负担,同时保障了群众的安全,使群众经济生活上得到了保障,保护野生动物的积极性也大幅度提升,实施野生动物栖息改造与生境恢复项目已初见成效。

参考文献

- [1] 郭贤明,王兰新.我国林火对生物多样性的影响研究综述[J].四川环境,2015,34(3):122-126.
- [2] 高沛.火在生态系统中的作用[J].生态学杂志,1992,11(1):41-47.
- [3] 邱扬.森林植被的自然火干扰[J].生态学杂志,1998,17(1):54-60.
- [4] 周道玮,张智山.草地火因子及其生态作用[J].中国草地,1996(2):73-76.
- [5] 舒立福,田晓瑞,寇晓军.计划烧除的应用与研究[J].火灾科学,1998,7(3):61-67.
- [6] 郑焕能,胡海清.火在森林生态系统平衡中的影响[J].东北林业大学学报,1990,18(1):8-13.
- [7] 牛树奎,严承高.林火对生物多样性的影响[C]//中国科学院生物多样性委员会,林业部野生动物和森林植物保护司.生物多样性研究进展:首届全国生物多样性保护与持续利用研讨会论文集.北京:中国科学技术出版社,1995:104-108.
- [8] 王冬米.关于森林健康及其经营的思考[J].华东森林经理,2010,24(3):11-15.
- [9] 周道玮,李晓波.草地计划火烧理论与技术[J].中国草地,1996(4):69-72.
- [10] 王兰新,赵建伟,郭贤明.我国计划烧除研究综述[J].林业调查规划,2015,40(6):17-21.
- [11] 陶庆,王兰新,赵建伟,等.西双版纳自然保护区开展计划烧除利弊分析[J].林业调查规划,2013,38(4):97-100.
- [12] 郭贤明.生物保护廊道规划研究[M].昆明:云南民族出版社,2013:1-15.
- [13] 田晓瑞,舒立福,乔启宇,等.南方林区防火树种的筛选研究[J].东北林业大学学报,2001,23(5):43-47.
- [14] 崔向清,马鑫,李丽,等.增加中期细胞数的染色体标本制备方法研究[J].中国现代医药杂志,2014,16(7):8-9.
- [15] 谭军,曹向宇,蔡磊明.鹌鹑骨髓细胞染色体制片新方法[J].农药,2005,44(12):544-545,548.
- [16] 姚应瑞.小白鼠骨髓细胞染色体制片技术[J].西安交通大学学报(医学版),1988(2):125.
- [17] 黄燕,赵小平,余红,等.动物骨髓细胞染色体标本制备失败的原因分析[J].生物学通报,2006,41(1):52-53.
- [18] 赵淑娟,庞有志,白俊艳,等.禽类骨髓细胞染色体标本制备实验方法的改进[J].实验动物科学,2010,27(2):17-20.
- [19] 李碧春,徐银学.动物遗传学实验教程[M].3版.北京:中国农业大学出版社,2012.
- [20] 王彬,孙晓玲,刘丽波.雄性小鼠生殖细胞染色体制备方法的研究[J].中国公共卫生,2004,20(3):259.
- [21] 刘俊,李栋,张亚龙,等.小鼠骨髓染色体G显带最佳制备方法的探究[J].畜牧与饲料科学,2012,33(5/6):21-22.
- [22] 朱娟娟,赵斌,刘莉茵,等.小鼠骨髓细胞染色体制备实验方法的改进[J].安徽医药,2007,11(8):768.
- [23] 李芳,王文青,尹敬如,等.三项条件改变制备小鼠骨髓细胞染色体的分析[J].青海医学院学报,1990(2):153-155.

(上接第103页)

- [4] 卢洪武,黎杰强,邓优美.小鼠骨髓细胞染色体G带制片技术的探讨[J].实验室研究与探索,2014,33(1):46-51.
- [5] 路玫,王佳丽,曹大明,等.针对对环磷酸腺苷模型荷瘤小鼠骨髓细胞DNA修复相关蛋白动态调节的研究[J].中华中医药杂志,2016,31(8):3230-3233.
- [6] 边高鹏,武有祯,焦海华.水胺硫磷致小鼠骨髓细胞DNA损伤和氧化损伤[J].生态学杂志,2015,34(5):1413-1419.
- [7] 闫玉军,徐文清,沈秀,等.银耳孢糖组分对¹³⁷Cs γ射线照射小鼠骨髓细胞染色体畸变及微核率的影响[J].中国辐射卫生,2014,23(1):54-56.
- [8] 徐林.人类疾病的动物模型[J].动物学研究,2011,32(1):1-3.
- [9] 薛丽香,张凤珠,孙瑞娟,等.我国疾病动物模型的研究现状和展望[J].中国科学:生命科学,2014,44(9):851-860.
- [10] 刘恩岐,北岛修司,森本正敏.实验小鼠在人类癌症研究中的应用及其进展[J].癌症,2005,24(2):249-254.
- [11] 刘涌涛,马全祥,刘慧娟.小鼠骨髓细胞染色体标本制备中的失误与对策[J].生物学通报,2003,38(6):53-54.
- [12] 刘庆军,孙永君.小鼠骨髓细胞染色体标本制备方法的改进[J].山东轻工业学院学报,2012,26(4):64-65.