

# 禽类染色体制备方法的比较研究\*

郑喜邦\*\* 何宝祥

张翊华

(广西大学动物科技学院 南宁 510003) (西北农林科技大学动物医学院 杨凌 712100)

**摘要** 以引进品种尼克红鸡为研究对象,对制备禽类染色体的外周血淋巴细胞培养法、羽髓法和改进的骨髓法进行了比较研究。结果表明:(1)外周血淋巴细胞培养法和羽髓细胞培养法制备染色体均未获得成功,因其操作复杂,技术条件要求高,周期长,成本高,可能不适宜于禽类的染色体制备。(2)直接羽髓法和改进的直接骨髓法以及骨髓短期孵育法却获得了成功,由于操作简便,周期短,成本低,适宜于禽类的染色体制备。

**关键词:** 禽类 染色体 制备

禽类常用的染色体制备方法有直接骨髓法、胚胎法、羽髓法和外周血淋巴细胞培养法,但每种方法都有其优点和缺点。骨髓细胞分裂指数高,制片方法简便,效果好,但直接骨髓法以牺牲供体的生命为代价。外周血淋巴细胞培养法的优点是采样不受季节限制,而且一份血样可连续多次应用,不伤害供体,制片效果也好,其缺点是操作较复杂,技术条件要求高。羽髓法的优点是取材容易,操作简便,无碍于供体的健康,其缺点是羽髓细胞分裂指数低,分裂相少。因此完全有必要对常用的染色体制备方法进行比较研究和必要的改进,使之更为安全实用、经济简便。

本文以引进品种尼克红鸡为研究对象,应用外周血淋巴细胞培养法、羽髓法和改进的骨髓法制备染色体标本;通过对三种染色体制备方法的比较研究,筛选出了适用于禽类(特别是稀有珍禽)染色体制备的简单经济和安全实用的方法。现将结果报道如下。

## 材料与方 法

### 1. 材料

(1) 试验动物 本试验用尼克红鸡共 44 只,其中公鸡 16 只,母鸡 28 只,均为 4 月龄育成鸡,由西北农林科技大学养鸡场提供。

(2) 试剂 RPMI1640 由 GIBCO 公司提供;胰蛋白酶由华美生物工程公司提供;胶原酶由 Sigma 公司分装(BE0251);PHA-P 由 Sigma 公司分装(BP0721);肝素钠由 BIB 公司分装(BC0321);淋巴细胞分离液由华美生物工程公司提供(BI0401);秋水仙素由 BIB 公司分装(BR0482);胎牛血清(FCS)由西北农林科技大学奶牛胚胎移植站提供。

其他试剂均为分析纯。

### 2. 方法

#### 1. 染色体标本制备方法

##### (1) 外周血淋巴细胞培养法

用 50IU/ml 的肝素湿润注射管壁,从鸡翼下静脉采血 8 - 10ml,分三组处理。第一组为微量全血培养,即将 0.2 - 0.3ml 血样直接加入 25ml 培养瓶中。第二组为淋巴细胞分离液分离淋巴细胞培养。将 2.5ml 抗凝血加入含等量 Hank's 液的青霉素小瓶中混匀,将混合液小心地重叠于含 5ml 淋巴细胞分离液的离心管中,2000rpm 离心 20min,小心吸取淋巴细胞层至另一支离心管中。用含 5% 犊牛血清的 Hank's 液洗涤 2 次,再用 RPMI1640 洗涤一次,制成细胞悬液,使细胞浓度达  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ ,将该细胞悬液加入培养瓶中。第三组为低速离心分离白细胞培养。将剩余的抗凝血加入离心管中,以 500rpm 低速离心 5 - 10min,分离出血浆(内含大量白细胞),将 0.5 - 1ml 血浆加入培养瓶中。培养瓶置入 CO<sub>2</sub> 培养箱中,39℃ - 41℃ 恒温培养 68 - 72h。培养结束前 2 - 3h,加入 20μg/ml 秋水仙素,使终浓度为 0.2 - 0.4μg/ml。培养结束后,将细胞培养物转移至离心管中,以 1500rpm 离心 10min,弃上清液。离心管中加入预热至 39℃ 0.075mmol/L KCL 溶液 6 - 8ml,在 39℃ - 41℃ 水浴锅中低渗处理 30 - 60min。以 1500rpm 离心 10min,弃上清液,沿管壁缓缓加入 3:1 甲醇:冰醋酸固定液 5 - 6ml,混匀,室温下静置 30min,再次离心,弃上清,加入新鲜固定液,如此反复固定 3 次,每次 30min。加入适量新鲜固定液制成细胞悬液,取冰冻载玻片,距离玻片 30 - 40cm 高度,向玻片滴 2 - 3 滴细胞悬液,空气干燥。用 1:9Giemsa 磷酸盐缓冲液(pH6.8)染色 30 - 60min,用自来水冲去染液,自然干燥,镜检。

##### (2) 羽髓法

\* 本文 2002 年 10 月 23 日收到,2003 年 5 月 3 日接受。

\* 陕西省林业厅“朱鹮染色体性别鉴定”课题资助。

\*\* 联系人。E-mail: zhengxibang@sohu.com

**羽髓短期培养法** 采用 Delhanty<sup>[1]</sup>和朱苏天<sup>[2]</sup>的方法,并加以改进。选择正处在生长期的初级或次级飞羽3-4根,75%酒精局部消毒。拔取羽毛,随即用手术剪剪下羽毛基部置于灭菌平皿中。用眼科小剪刀纵剖羽杆,剔取羽髓组织,放入灭菌青霉素小瓶中,以灭菌生理盐水洗涤数次,除去少量红细胞。0.1%胶原酶或0.25%胰酶和等量0.02% EDTA处理:将团状的羽髓组织用眼科剪剪碎,加入2ml 0.1%胶原酶溶液或2ml 0.25%胰酶和等量0.02% EDTA,39℃水浴。0.1%胶原酶处理1-3h时,每隔0.5h摇动一次;0.25%胰酶和0.02% EDTA处理30min,每隔10min摇动一次。胰酶处理结束时,加入适量含犊牛血清的RPMI1640培养液,以终止酶的活性。将上述消化液过筛网,并转移至离心管中。1500rpm离心10min,弃上清液。加少许RPMI1640培养液制成细胞悬液,将细胞浓度调整为 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ ,以滴管将细胞悬液移入含5ml RPMI1640培养液的培养瓶中,置39℃-41℃ CO<sub>2</sub>培养箱中培养48-72h。其余步骤同外周血淋巴细胞培养法。

**直接羽髓法** 采用 Shoffner<sup>[3]</sup>,曾科文<sup>[4]</sup>和金煜<sup>[5]</sup>的方法,并加以改进。首先在鸡翅上找到正处于生长期的初级或次级飞羽,将250、300、400、500μg/ml的秋水仙素注入这些生长期飞羽根部的软翻内。分别在注射后30、45、60min拔取羽毛。然后获取羽髓,经胰酶或胶原酶消化处理,不再进行细胞培养直接制备染色体标本,方法同外周血淋巴细胞培养法。

### (3) 改进的骨髓法

**改进的直接骨髓法** 以2-3μg/g体重秋水仙素腹腔注射,作用2-4h。屈曲膝关节,使股骨头突出,局部以75%酒精消毒,以8-9#针头用力刺入股骨头,并沿股骨长轴送入少许,接1ml注射器抽取0.2-0.3ml骨髓。然后直接进行低渗、固定、滴片、染色,方法同外周血淋巴细胞培养法。

**骨髓细胞短期孵育法** 骨髓采集同改进的直接骨髓法。在培养瓶中事先加入含0.2-0.3μg/ml秋水仙素的RPMI1640培养液5-6ml,待加入骨髓后置39-41℃ CO<sub>2</sub>培养箱孵育,将抽取的骨髓通过培养瓶胶塞注入培养瓶中,39-41℃孵育3-4h。以后的制片程序同改进的直接骨髓法。

## 2. 分析方法

采用生物统计学中的F检验或t检验对细胞分裂相数量进行统计分析。

## 结 果

1. 通过反复试验,以淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,在39、40、41℃条件下分别培养68、70和72h,以0.2、0.3、0.4μg/ml秋水仙素中期阻断,均获得了中期分裂相(见图1),但数量少;而在相同培养条件下微量全血培养和低速离心分离白细胞培养均未获得中期分裂相。

2. 分别以胰酶和胶原酶分离羽髓细胞,在39、

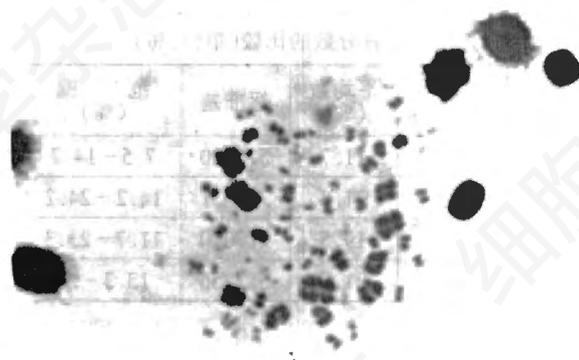


图1 外周血淋巴细胞中期分裂相(100×)

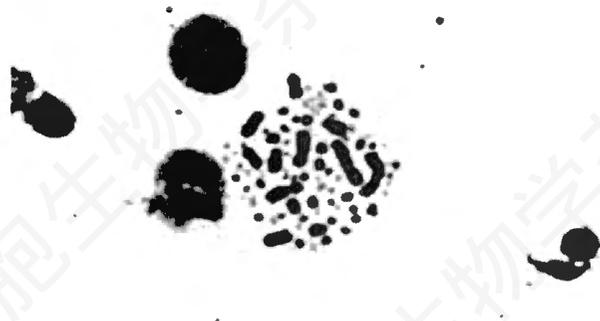


图2 羽髓细胞中期分裂相(100×)



图3 骨髓细胞中期分裂相(100×)

40、41℃条件下分别培养48和72h,以0.2、0.3和0.4μg/ml秋水仙素中期阻断,均未获得中期分裂相。然而,以250、300、400和500μg/ml的秋水仙素注入生长期飞羽根部的软翻内分别处理30、45和60min均获得了中期分裂相(见图2)。

3. 分别以2和3μg/g体重的秋水仙素腹腔注射,作用2、3和4h,股骨头穿刺抽取骨髓,均获得了大量分裂相。以同法采集骨髓,分别加入含0.2和0.3μg/ml秋水仙素的培养液中在39、40和41℃条件下孵育3h和4h,均获得了中期分裂相(见图3)。

表 1 四种不同剂量秋水仙素处理羽髓获得分裂相平均百分数的比较(单位: %)

剂 量 ( $\mu\text{g/ml}$ )	染色体 标本数量	平均数 (%)	标准差	范 围 (%)
250	10	11.7	5.6320	7.5-14.2
300	10	21.3	3.9531	14.2-24.2
400	10	19.5	4.7070	11.7-23.3
500	10	21.9	5.7756	13.3-25

## 讨 论

微量全血培养和低速离心分离白细胞培养是制备人类和哺乳动物染色体标本的常用方法,然而在本试验中,用这两种方法制备尼克红鸡的染色体却遭到了失败。我们借鉴免疫学上检测鸡淋巴细胞体外转化效果的方法<sup>[6,7]</sup>,设计了用淋巴细胞分离液

表 2 不同时间与秋水仙素水平对羽髓分裂相平均百分数的影响( $n=10$ ,单位: %)

分裂相 时 间	秋水仙素	250 $\mu\text{g/ml}$	300 $\mu\text{g/ml}$	400 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$
	30 分钟		22	18.8	20.6
45 分钟		13	23.4	21.6	21.9
60 分钟		13	18.7	21.4	23.4
F 检验		$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$

表 3 胰酶和胶原酶对羽髓细胞中期分裂相平均百分数的影响( $n=10$ ,单位: %)

分裂相 酶 名	秋水仙素	250 $\mu\text{g/ml}$	300 $\mu\text{g/ml}$	400 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$
	胰酶		10	14.3	16.3
胶原酶		20.7	24.5	23.9	23.5
t 检验		$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$

分离淋巴细胞进行培养并制备染色体的方法,而且也取得了成功。以该法分离的淋巴细胞中红细胞很少,对制片效果影响小,但分裂相少,结果不令人满意。外周血淋巴细胞培养常用的有丝分裂原有植物血凝素(PHA)、刀豆球蛋白A(conA)和美洲商陆(pokeweed mitogen, PWM)。学者 Pink 认为,不同品系鸡的淋巴细胞对不同有丝分裂原的反应存在遗传性差异<sup>[6]</sup>。李庆章等发现肉用 AA 雏鸡对 T 淋巴细胞分裂原 PHA 的反应性很低,而对 ConA 则属高反应性鸡<sup>[6]</sup>。由此可以推测,除了禽类的血液组成特殊外,造成上述试验失败和分裂相少的原因,可能与尼克红鸡对 PHA 的反应性过低有关。

羽髓细胞短期培养也因技术条件过高而未获成功。其中的一个突出问题,就是羽髓细胞不贴壁,不形成细胞单层。尽管我们完全模仿朱苏天等<sup>[2]</sup>和 Delhanty<sup>[1]</sup>采用的羽髓细胞培养条件也未能获得细胞单层,更没有获得中期分裂相;反复多次改变羽髓细胞培养的组合条件,如培养液种类、培养温度及时间、胶原酶浓度和处理时间等,但仍以失败告终。

然而,直接羽髓法制备尼克红鸡染色体标本却

获得了极大成功。我们分别采用 250、300、400 和 500 $\mu\text{g/ml}$  的秋水仙素注入生长期飞羽根部的软翻内处理 30-60min,均获得了中期分裂相,没有发现染色体过度浓缩甚至破裂的现象。300、400 和 500 $\mu\text{g/ml}$  秋水仙素飞羽软翻注射获得的中期分裂相明显多于 250  $\mu\text{g/ml}$ 。秋水仙素分别作用 30、45、60min,获得中期分裂相的数目没有明显差异( $P>0.05$ )。本试验中分别采用角质化程度不一的羽髓组织制备染色体标本,发现角质化程度低的飞羽比角质化程度高的飞羽能获得更多的分裂相,这与白秀娟等<sup>[8]</sup>的报道相一致。曾科文等<sup>[4]</sup>、金煜等<sup>[5]</sup>和 Shoffner 等<sup>[3]</sup>在秋水仙素作用完毕后,直接制备染色体。但本试验结果证实,用胰酶或胶原酶处理的羽髓组织获得的中期分裂相明显多于未经消化的羽髓组织,而且经胶原酶消化的羽髓组织获得的中期分裂相也明显多于经胰酶消化的羽髓组织( $P<0.05$ )。这是因为胰酶适宜于消化细胞间质少的软组织,但对纤维性组织的效果较差;羽髓组织富含胶原纤维,胶原酶对胶原的消化作用很强,而且仅对细胞间质有消化作用,对所分离的细胞不会产生有害

作用<sup>[9]</sup>。

鉴于骨髓细胞分裂指数高的优点并借鉴人医临床检查白血病制备染色体的方法<sup>[10,11]</sup>,我们设计了改进的骨髓法和骨髓短期孵育法。用这两种方法制备尼克红鸡染色体标本均获得了良好效果。改进的直接骨髓法需要腹腔注射秋水仙素,有可能对机体产生毒性反应。但是,在一次试验中,我们分别以2和3 $\mu\text{g/g}$ 体重剂量对2只尼克红鸡进行腹腔注射,作用2.5-3.5h后股骨头穿刺抽取骨髓制备染色体,并没有处死试验鸡,而且饲养达15天,经观察没有发现任何异常反应,也未出现关节僵硬和跛行症状。本试验中使用的秋水仙素腹腔注射剂量是Shoffner<sup>[3]</sup>推荐剂量的5-7.5倍。由此可见,秋水仙素的安全范围较大。以股骨头穿刺抽取骨髓的试验鸡无一例发生感染。

综上所述,外周血淋巴细胞培养法和骨髓细胞培养法虽然取材方便,对供体无伤害,但是操作复杂,技术条件要求高,周期长,成本高,且易于污染,可能不适宜于制备禽类染色体。与此相反,直接骨髓法,改进的直接骨髓法和骨髓短期孵育法操作简便,不需要细胞培养,周期短,成本低,适宜于禽类(特别是稀有珍禽)的染色体制备。改进的直接骨髓

法和骨髓短期孵育法克服了直接骨髓法“杀鸡取卵”的缺点,而且也取得了同样好的制片效果。与直接骨髓法一样,改进的直接骨髓法可能对供体产生一定的毒害作用,掌握适宜的秋水仙素腹腔注射剂量显得尤为重要。直接骨髓法和骨髓短期孵育法对供体健康无损害。总而言之,直接骨髓法和骨髓短期孵育法是制备禽类染色体的简单、经济和安全实用的方法。

### 参 考 文 献

- [1] Delhanty J. D. A., 1989, *Veterinary Record*, **125**:92-93.
- [2] 朱苏天等,1987, *动物学研究*, **8**(1):21-25.
- [3] Shoffner R. N., et al., 1967, *Poultry Science*, **46**:333-344.
- [4] 曾科文等,1992, *野生动物*, (4):38-40.
- [5] 金煜等,1996, *野生动物*, (1):29-30.
- [6] 李祥瑞等,1996, *畜牧与兽医*, **28**(1):3-4.
- [7] 李庆章等,1994, *中国兽医杂志*, **20**(9):18-20.
- [8] 白秀娟等,1997, *经济动物学报*, **1**(1):51-53.
- [9] 司徒镇强等编著. 1996, *细胞培养*, 北京, 广州, 上海, 西安, 世界图书出版公司.
- [10] 薛志科等,1993, *中华医学遗传学杂志*, **10**(2):102-103.
- [11] 陈志哲等,1991, *细胞生物学杂志*, **13**(4):182-185.

## COMPARATIVE STUDIES ON PREPARATION OF AVIAN CHROMOSOMES\*

ZHENG Xi Bang\*\* HE Bao Xiang

(College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005)

ZHANG Yi Hua

(College of Animal Medicine, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100)

**ABSTRACT** As the techniques for preparing avian chromosomes, peripheral blood lymphocyte culture, feather pulp techniques (including feather pulp culture and direct feather pulp) and two kinds of modified marrow techniques were comparatively studied in Nike Red chicken. The results showed that: (1) the peripheral blood lymphocyte culture and the feather pulp culture didn't succeed on preparing chromosomes, which may be not adoptable to prepare the avian chromosomes because of complicated technique, long cycle, and high cost. (2) the direct feather pulp, the modified direct marrow and the marrow short-term culture did succeed, and owing to their simple operation, short cycle and low cost, they were suitable for preparing avian chromosomes.

**Key words:** Avian Chromosome Preparation

\* This study was endowed by the research program—Studies on Chromosomal Sex Identification of Crested Ibis, coming from Forestry Department of Shanxi Province.

\*\* Corresponding author. E-mail: zhengxibang@sohu.com