



## 牦牛(*Bos grunniens*)染色体的研究

陈文元 王喜忠 王子淑\*

(四川大学生物系细胞研究室)

张成忠

余桂馨

(西南民族学院牧医系)

(成都凤凰山种公牛站)

牦牛独产于中亚,以我国最多,其次是蒙古、苏联、尼泊尔。我国现有牦牛1,200多万头,占世界牦牛总数85%以上,占我国养牛业的14%以上。但由于我国牦牛还是一个原始牛种,生长发育缓慢、生产性能低,远远不能适应国民经济发展的需要。长期以来,国内采用家牛和牦牛进行种间杂交,已取得具有杂种优势的杂一代犏牛。自本世纪开始,又围绕牦牛杂种后代雄性不育问题进行了多方面的研究,但仍然没有得到解决。近年来国外对牛科中多种动物的染色体进行了研究<sup>[1,2,3]</sup>,但尚未见牦牛染色体的报道,为了填补空白,并对今后牦牛细胞遗传研究提供参考,我们对牦牛的染色体进行了研究。

### 材料和方法

#### 一、实验材料

实验用牦牛4头(公牛2头,母牛2头)。

#### 二、淋巴细胞培养

培养基成分:伊格氏液(Eagle's MEM)40毫升,小牛血清7.5毫升,PHA 0.4毫升,肝素0.3毫升(用0.85% NaCl配制成1000单位/毫升)青、链霉素各5000单位。用NaHCO<sub>3</sub>调整到pH6.8,然后分装成10个培养瓶,每瓶培养基约4.8毫升。

采血培养:在颈侧面剪毛消毒后用20毫升注射器(先吸入肝素约1毫升)从颈静脉采血15—20毫升,将肝素血分别注入4只无菌离心管,离心10—20分钟(500转/分)约可分离出30—40%血浆,去掉上层大部分血浆,吸取血浆与血球界面部分共约3—4毫升,接种于5—6个培养瓶中。在38.5℃温箱中培养70—72小时,培养终止前5—6小时加入2微克/毫升秋水仙素3滴(5号针头),使其最终浓度为0.01—0.015微克/毫升。

#### 三、染色体标本制作

培养完成后,将每瓶培养物分别倾入锥形管,离心8—10分钟(1800转/分),去掉大部分上清液,留细胞沉淀和上清液共约1毫升,将沉淀与上清液用吸管混匀,加入0.2% KCl 6.5毫升,在室温下低渗15分钟,离心8分钟(1800转/分),去掉上清液及红细胞碎片,沿管壁缓缓加入新配制的甲醇、冰醋酸(3:1)固定液约5毫升,固定15分钟后,将细胞沉淀用吸管冲散,再固定10—15分钟,离心6分钟(1200转/分),去掉上清液,重复固定2—3次,去掉上清液,加少许固定液,冲散,滴于湿冷载玻片上,文火烘干。

#### 四、G—带染色

用张思仲<sup>[4]</sup>的方法,稍加改变,步骤如下:

(1)用0.85% NaCl配制0.1%胰蛋白酶(1:250)溶液,再用5% NaHCO<sub>3</sub>调至pH6.8—7.0,胰蛋白酶溶液置冰箱保存。

(2)配制0.02% 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)溶液置冰箱保存。

(3)临用前按1:1的比例混合上述两种溶液于染缸中。

(4)将预先在37℃温箱中处理过2—3小时,“片龄”在3—30天的标本在室温下(15—25℃)浸入胰酶溶液中60—75秒。

(5)在pH6.8磷酸缓冲液中漂洗数秒后,立即投入1:20的Giemsa染液中染40—60分钟。

(6)自来水冲洗数秒,空气干燥。

#### 五、C—带染色

在Swanner<sup>[5]</sup>方法的基础上略加修改。用“片龄”在2—7天的标本,按下列步骤处理。

(1)放入新配制的5% Ba(OH)<sub>2</sub>(过滤,盛于染缸加盖),在50℃水浴中处理1—2分钟。

\* 参加实验的还有成都市动物园叶志勇、何光昕、宋云芳,西南民族学院颜淑芳、徐小波,川大生物系细胞室张矛、张彬等同志,并得到成都市动物园和工农兵奶牛场大力支持,表示衷心感谢。

- (2) 用 0.85% NaCl 溶液 (50℃) 洗 3 次。  
 (3) 经 75% 酒精洗 2 次, 95% 酒精洗 2 次, 空气干燥。  
 (4) 用湿室法, 将标本平放于培养皿内的支架上, 加 1—2 滴  $6 \times \text{SSC}$  ( $\text{SSC}$  由 0.15M 氯化钠, 0.015M 柠檬酸钠组成) 于标本上加上盖片, 培养皿中另加少许  $6 \times \text{SSC}$  溶液, 但勿与玻片标本接触, 盖好培养皿, 移入 60℃ 温箱, 保温 20—24 小时。

(5) 经 75% 酒精 (2 次), 95% 酒精 (2 次) 脱水, 空气干燥。

(6) 在染液中染 1 小时, 水洗数秒, 空气干燥。

[染液配制: 蒸馏水 50 毫升, 甲醇 1.5 毫升, 柠檬酸—磷酸盐缓冲液 (0.2M 磷酸氢二钠用 0.1M 柠檬酸调整到 pH7.0) 1.5 毫升, Giemsa 原液 5 毫升]。

## 结 果

### 1. 核型分析

牦牛体细胞染色体数目为  $2n = 60$ , 除性染色体 (X 染色体, Y 染色体) 为亚中部着丝粒染色体外, 其余常染色体均为近端着丝粒染色体, 牦牛常染色体的短臂一般较明显。

染色体依长短顺序排列为 30 对 (包括性染色体)。

### 2. G—带带型分析

观察 50 个细胞, 其中选 10 个细胞的 G—带照片剪贴排队, 进行比较分析, 结果是: [图版图 1, “雄性牦牛 G—带带型图”]。

1 号染色体 长臂近着丝粒端宽和窄的深带各两条, 中部一条窄的浅带, 两条宽的浅带, 远端有四条深带, 短臂显著, 有时可见 1—2 条窄的深带。

2 号染色体 长臂近着丝粒端有一条深带, 近中至中部 3 条浅带两条深带交错排列, 远端 3 条深带。短臂显著, 可见 1—2 条窄的深带。

3 号染色体 长臂近端有一条深带, 间隔两条浅带, 中部至远端三条深带, 远端两条浅带。短臂显著, 可见 1—2 条窄的深带。

4 号染色体 长臂近端一条宽的深带, 中部两条深带, 间隔一条窄的浅带, 远端一条宽的深带。短臂显著, 可见一条窄的深带。

5 号染色体 长臂近端有一条较宽的深带, 两条较窄的深带, 间隔一条浅带, 远端有两条深带, 短臂显著, 可见一条窄的深带。

6 号染色体 长臂近端一条浅带, 间隔一条深带, 中部有两条浅带, 两条深带, 远端三条窄的深带, 染色体缩短时只能见两条深带。短臂显著, 可见一条窄的深带。

7 号染色体 长臂近端有两条较宽的深带, 中部和远端各有两条深带。短臂显著, 可见一条窄的深带。

8 号染色体 长臂近端至中部有三条较宽的深带, 远端有三条窄的深带。短臂显著, 可见一条窄的深带。

9 号染色体 长臂近端、中部、远端各有两条深带。短臂显著, 可见一条窄的深带。

10 号染色体 长臂近端有一条较宽的深带, 中部至远端均匀分布四条较窄的深带。短臂显著, 可见一条深带。

11 号染色体 长臂近端和远端各有两条深带, 中部为一条窄的浅带。短臂显著, 可见一条深带。

12 号染色体 长臂近端有一条浅带, 中部均匀分布三条深带, 远端一条窄的深带。短臂显著, 可见一条深带。

13 号染色体 长臂近端有宽、窄深带各一条, 远端两条深带。短臂显著, 可见一条深带。

14 号染色体 长臂近端有一条宽的深带, 近中部一条浅带, 远端三条窄的深带。短臂显著, 可见一条窄的深带。

15 号染色体 长臂近端有两条宽的深带, 远端两条窄的深带。短臂有一条浅带。

16 号染色体 长臂近端有两条深带, 远端有两条深带。短臂有一条浅带。

17 号染色体 长臂近端有一条宽的深带, 远端有一条窄的浅带和一条窄的深带。短臂有一条浅带。

18 号染色体 长臂近端和远端各有一条浅带, 中部分布两条深带。短臂有一条浅带。

19 号染色体 长臂近端有一条宽的深带, 中部一条浅带, 远端有一条深带, 可见短臂。

20 号染色体 长臂近端为两条深带, 远端两条窄的浅带, 可见短臂。

21 号染色体 长臂近端和远端各有一条深带, 中部有一条浅带, 可见短臂。

22 号染色体 长臂近端两条深带, 远端分布两条浅带, 可见短臂。

23 号染色体 长臂近端有一条窄的深带, 中部为一条浅带, 远端为一条宽的深带, 可见短臂。

24 号染色体 长臂近端有一条窄的深带, 中部一条宽的深带, 远端一条浅带, 可见短臂。

25 号染色体 长臂近端和远端各有一条窄的浅带, 中部为一条宽的深带, 可见短臂。

26 号染色体 长臂近端至中部有两条深带, 可见短臂。

27 号染色体 长臂近端为一条宽的深带, 远端为一条窄的深带, 可见短臂。

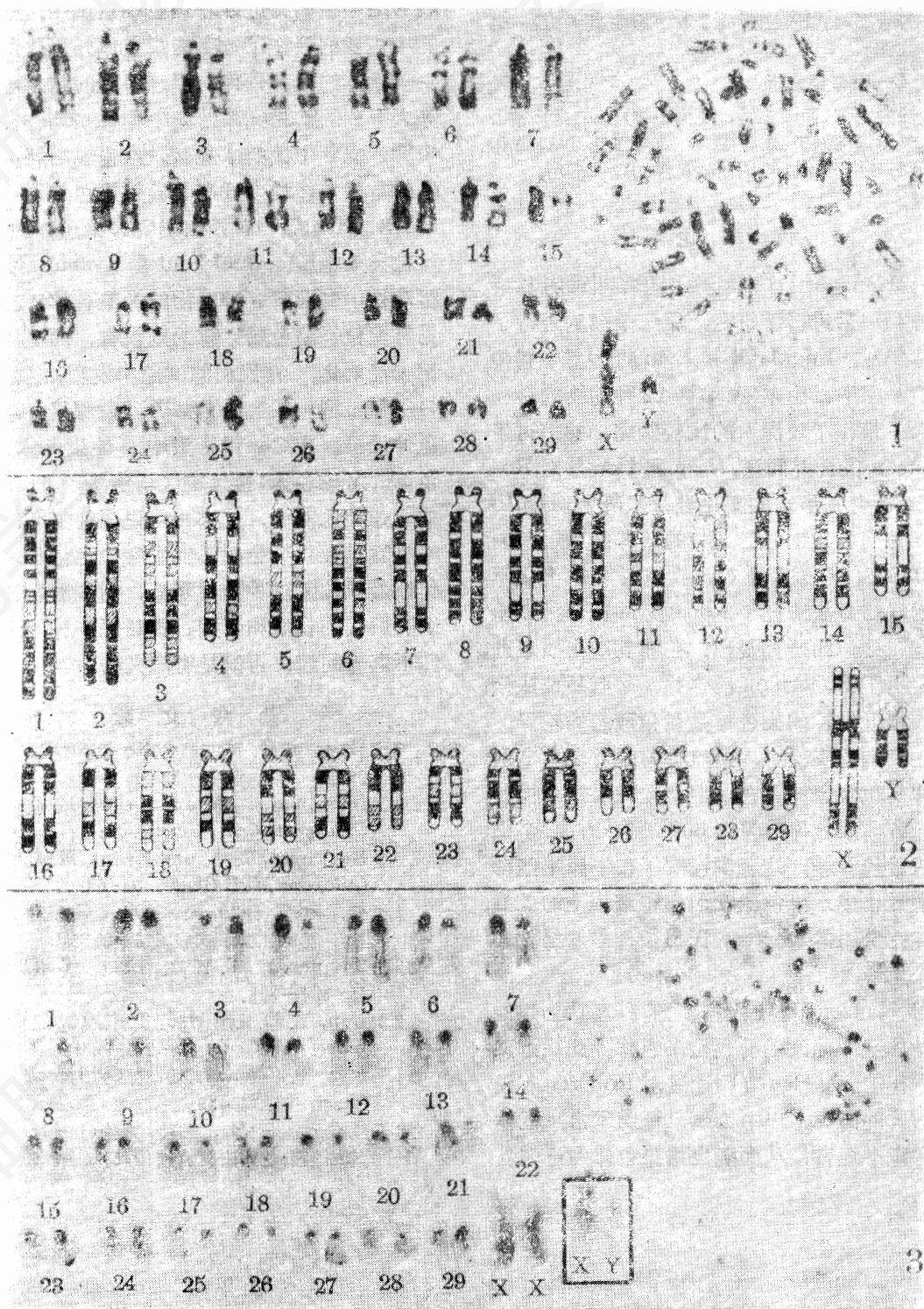
28 号染色体 长臂中部为两条宽的深带, 可见短臂。

29 号染色体 长臂近中部有一条较宽的深带, 远端有一条较窄的深带, 可见短臂。

X 染色体 短臂远端两条窄的深带。长臂近端两条窄的深带, 远端有一条较窄的深带和两条较宽的深带。着丝粒区深染。

Y 染色体 短臂浅染, 整个长臂均匀分布三条窄的深带。

常染色体着丝粒区浅染, 1—14 号染色体短臂很



明显。

根据以上的观察和分析,我们绘制了牦牛染色体的G一带带型模式图[图版图2。“雄性牦牛G一带带型模式图”]。

### 3. C一带带型分析

除性染色体(X染色体、Y染色体)外,全部常染色体着丝粒区均深染[图版图3。“雌性牦牛C一带带型图(方框内为雄性牦牛性染色体的C一带)”]。

## 讨 论

1. Hanson<sup>[1]</sup>首先用芥子喹吡啶对奶牛染色体的Q一带进行了研究,用三个细胞进行了染色体配对。Buckland和Evans<sup>[2,3]</sup>对牛科中的奶牛、家牛、山羊、家羊等12种动物的G一带和C一带作了较深入的比较研究,并探讨了Robertson氏合并问题。Lan和Hsu<sup>[6]</sup>对Robertson氏合并形式的变化进行了研究。Hsu<sup>[7]</sup>等对几种哺乳动物(鼠、牛)的培养细胞用Hoechst33258,丝裂霉素C,放线菌素D等化学药物诱导的方法研究了Robertson氏合并和串联易位。他们的研究提出,在哺乳动物核型进化中,由于Robertson氏合并,串联易位或分离形成相近物种间染色体数目和形态的差异。

在我们的实验中,虽然也偶尔发现有个别染色体易位现象的存在,但是在牦牛这个物种中,一方面染色体数目为60;另一方面常染色体短臂较显著,这至少说明了在牛属某些动物核型进化中,染色体在形态和结构上的差异还不能完全用Robertson氏易位,串联易位和分离来解释。

2. Hansen<sup>[1]</sup>曾追述了,有作者认为牛的常染色体全部为近端着丝粒染色体。此后,又有不少作者,如Hsu等<sup>[7]</sup>通过对Robertson氏合并方式的研究,以牛为例,证明了常染色体均具有微小短臂,从而确定常染色体为近端着

丝粒染色体。我们在家猪染色体的研究中亦证明E组染色体为近端着丝粒染色体<sup>[8]</sup>。在本试验中,我们除作了牦牛的染色体外,还用了奶牛染色体的G一带作对照,得到的结果与Hsu等人得到的结果一致,奶牛和牦牛均存在微小短臂,但牦牛比奶牛显著,这也说明牦牛和奶牛的常染色体均为近端着丝粒染色体。

3. Hsu等<sup>[7]</sup>曾指出奶牛X染色体没有着丝粒异染色质。Buckland和Evans<sup>[3]</sup>研究牛科动物中牛亚科5种动物的X染色体,有的可见着丝粒异染色质,有的则没有,而Y染色体都未能确定。在我们的试验中发现,牦牛的G一带带型中,X染色体着丝粒深染,而常染色体浅染。在C一带带型中,性染色体(X染色体,Y染色体)着丝粒区均浅染,而常染色体着丝粒区深染,这亦可能说明牦牛X、Y均缺少着丝粒异染色质。牦牛常染色体和性染色体在着丝粒区这种差异现象,对今后研究牦牛杂交后代的核型和带型,探讨牦牛种间杂交雄性不育等问题,可能是有意义的。

## 参 考 文 献

- [1] Hansen, K. M. 1972. *Hereditas*, 70: 225-234.
- [2] Buckland, R. A. and Evans, H. J. 1978. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 21: 42-63.
- [3] Buckland, R. A. and Evans, H. J. 1978. *Cytogenet. Cell Genet.*, 21: 64-71.
- [4] 张思仲等. 1979, 人体染色体G-显带方法, 中华医学杂志 59 (4) 210-213.
- [5] Sumner, A. T. 1972. *Exptl. Cell Res.*, 75: 304-306.
- [6] Lan, Y. E. and Hsu, T. C. 1977. *Cytogenet. Cell Genet.*, 19: 231-235.
- [7] Hsu, T. C. et al. 1978. *Cytogenet. Cell Genet.*, 21: 86-98.
- [8] 陈文元, 王子淑, 1979, 家猪(jus scrofa)体细胞染色体研究. 遗传(5) 4-6页.