文章编号: 1004-7271(2005)04-0457-03

·研究简报·

半微量全血培养法制备罗非鱼染色体标本的条件探索

The research for the half-micro blood lymphocytic cell cultivation of the preparation of chromosome of tilapia

曹丽萍, 丁炜东

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,江苏 无锡 214081)

CAO Li-ping, DING Wei-dong

(*Freshwater Fisheries Research Center*, *Chinese Academy of Fishery Science*, *Wuxi* 214081, *China*)

关键词:细胞培养;罗非鱼;染色体

Key words: cell cultivation; tilapia; chromosome

中图分类号:S 917 **文献标识码**: A

鱼类染色体的制作方法最常用的是PHA体内培养肾细胞制片法,对野外没有良好设备的情况,此法尤为适用,但这种方法要求剖杀鱼,不利于鱼种的保存,尤其是对稀有鱼类和种鱼不太合适。因此建立一种一般实验室能够开展的方便稳定的染色体制片方法势在必行。大量研究证实采用鱼类外周血淋巴细胞培养制备染色体的方法能有效地解决这些问题[1,2]。本研究以罗非鱼为材料,对鱼类外周血淋巴细胞培养条件进行了探索,初步建立了能够制备优质染色体制片的方法,为进一步研究染色体的结构、基因定位、荧光原位杂交等奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

RPMI 1640全培养基[RPMI 1640培养基,20%胎牛血清,0.5%青霉素-链霉素(10 000 U/mL),PHA],试验鱼由无锡淡水渔业研究中心试验场提供。

1.2 方法

1.2.1 采血及血液保存时间

1 mL注射器吸取少量500 U/mL肝素钠溶液润湿管壁,试验鱼用酒精棉球消毒尾部体表后,在侧线鳞处采2 mL血液,排掉最初的1~2滴血液,每3 mL全培养基中注入3~4滴血液,轻轻摇匀后盖好盖,置于30 ℃,5% CO_2培养箱中,培养72~96 h[3],剩余的血液置于4 ℃冰箱中,分别于1 d、5 d、10 d后进行细胞培养。

收稿日期:2005-04-19

基金项目:国家自然科学基金项目(30371116)

作者简介:曹丽萍(1977-),女,江苏无锡人,硕士,主要从事鱼类细胞生物学研究。E-mail:caolp@ffrc.cn

1.2.2 秋水仙素浓度及作用时间

细胞终止培养前1、2、3、4、5 h分别按梯度滴加秋水仙素至终浓度0.04 μg/mL、0.05 μg/mL、0.08 μg/mL、0.1 μg/mL。终止培养时,将细胞轻轻打匀,移入锥形离心管中,并用少量生理盐水清洗,将培养瓶内残留的细胞洗出倒入离心管,以1 200 r/min离心10 min,弃去上清,保留0.5 mL上清液及细胞沉淀。

1.2.3 低渗时间及温度

轻轻吹打沉淀使其形成细胞悬液,加入低渗液(0.075 mM KCl)10 mL,吹打均匀后于40 ℃、37 ℃、25 ℃水浴,每个实验温度分别低渗15 min、30 min、1 h 、1.5 h后,1000 r/min离心5 min。

1.2.4 固定

弃去上清,留0.5 mL左右上清液及细胞沉淀,轻轻吹匀沉淀后,加入现配的卡诺氏固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)[4],室温静止固定15 min,1 000 r/min离心5 min。重复固定2次。

1.2.5 滴片及染色

第3次固定后,离心弃上清液,加入少许新鲜配制的固定液,吹匀沉淀制成细胞悬液,取冷冻玻片成45度角,以一定高度滴取2~3滴细胞悬液,迅速在火焰上烤干,吉姆萨染色液中室温染色1.5 h,冲洗、晾干、镜检。

2 结果

2.1 血液保存时间

全血在分别保存1 d、5 d、10 d后进行细胞培养,细胞生长状况良好,都可制备出具有较好分裂相的染色体玻片。

2.2 秋水仙素浓度及作用时间

秋水仙素的加入时间、剂量、浓度与有丝分裂中期染色体分裂相的多少和长短有密切关系。加入量不足,染色体臂过于浓缩、瘦长(图版-A);加入量过多时,染色体太短(图版-B),分裂相少。实验结果表明,在细胞终止培养前2~3 h加入终浓度为0.05 μg/ mL左右的秋水仙素时,可以获得较多的分裂相,且染色体长度合适。

2.3 低渗时间及温度

低渗时间不少于30 min为宜。低渗不充分染色体分散不好,铺展不开,聚在一起(图版-C);低渗过头,则造成染色体丢失,结构模糊(图版-D)。低渗温度对染色体制备的质量影响不大。

经过以上分析可以得出:全血细胞在CO_2培养箱中经30 ℃、培养72~96 h,培养终止前2~3 h加入浓度为0.05 ug/mL左右的秋水仙素,低渗30 min后固定、滴片及染色,可以制备出分裂相较好的染色体玻片(图版-E)。

3 讨论

3.1 全血保存时间、细胞换液、PHA作用浓度及全血与培养基加入比例

全血在4 ℃保存一定时间后进行细胞培养,虽然在培养过程中产生一些细胞碎片,但不会影响染色体质量。这可能是因为低温使得一部分已衰老的血细胞死亡,减少了红细胞量,从而降低了培养过程中培养基pH值变化幅度的缘故[5]。

鱼的血细胞在培养过程中贴壁不是很牢固,所以在培养过程中不宜进行细胞换液,否则会导致细胞丢失,影响细胞生长速度,减少染色体分裂相。

国内所用PHA一般为粗制品,无严格的质量标准,不同批产品的活力往往不同,因此,在正式实验前,必须测定所选产品的最适浓度,即将PHA稀释成不同浓度,按正式实验方式检测同一样本,一般最适浓度为50~200 μg/mL[3]。

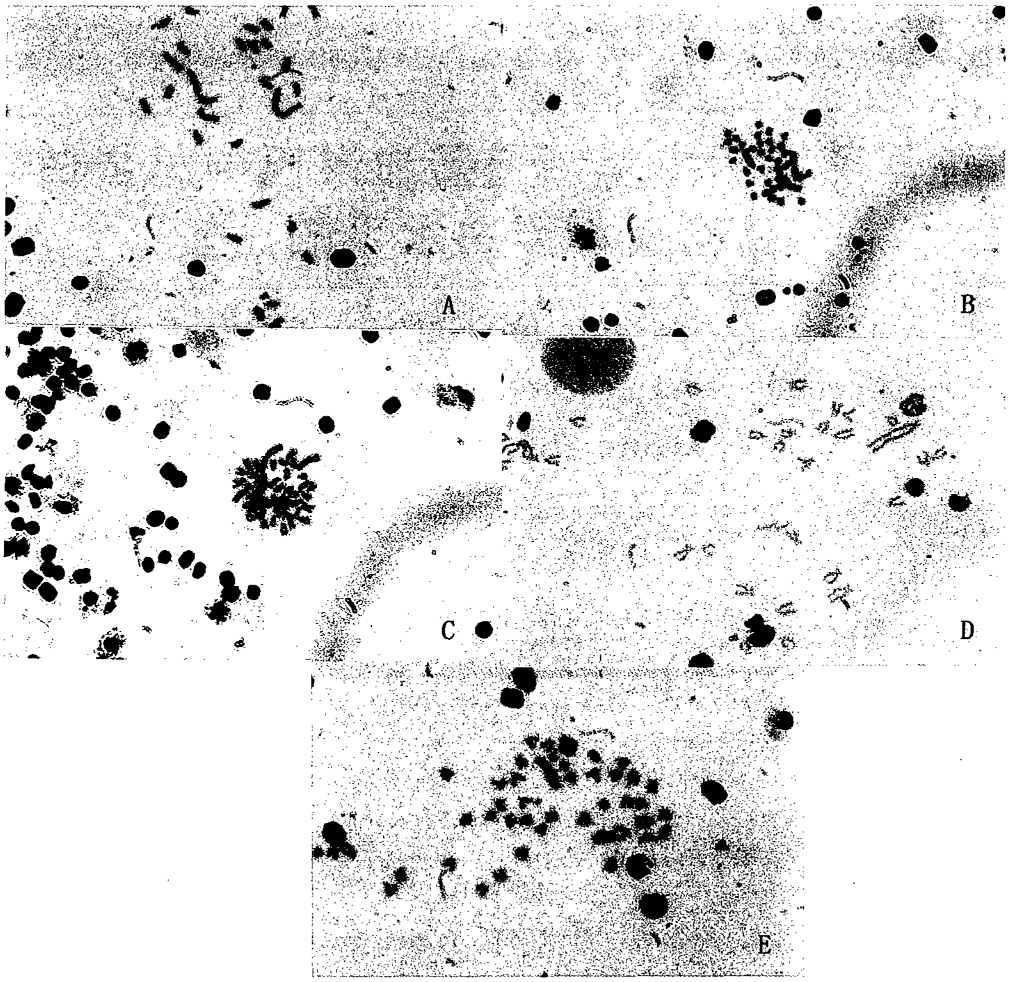

图1　染色体在不同处理条件下的形态

A:0.04 μg/mL秋水仙素作用2 h; B:0.1 μg/mL秋水仙素作用2 h; C:0.05 μg/mL秋水仙素作用3 h,低渗15 min; D:0.05 μg/mL秋水仙素作用3 h、低渗60 min; E:0.05 μg/mL秋水仙素作用2 h,低渗30 min。

制备全血染色体,接种时加入的血液量多少也会对培养结果产生影响。每3 mL全培养基中加入0.2 mL全血是比较适宜的,过少,细胞稀薄,生长速度减慢;过多,营养不足,细胞易脱壁死亡。

3.2　收获细胞及制片中的操作

收获细胞和制片过程中的人为操作对试验的最终结果也有很大影响。离心收集细胞时应避免吸掉与上清液相接处的淋巴细胞层;低渗前后离心速度及吹打力度也要注意改变;固定液加入时应沿管壁慢慢加入并轻轻吹打均匀,可以防止出现细胞团快及毛刷状染色体;滴片时采用0 ℃预冷的玻片,有利于染色体的进一步扩散舒展等。

本实验摸索的实验条件,可快速有效的制备出清晰完整的中期染色体,可广泛应用于多种鱼样品染色体的制备,为鱼类种质研究、种群鉴定以及染色体原位杂交等方面研究奠定基础。

参考文献:

[1]　贾印峰,单良鹏,高素平,等.人体外周血淋巴细胞的培养染色体标本制作方法的探讨[J].济宁医学院学报,2000,23(3):44-45.
[2]　孔庆友,孙　媛,王　茜,等.人体外周血淋巴细胞的培养与染色体标本制备实验的改进[J].大连医科大学学报,2001,23(3):228.
[3]　薛庆善.体外培养的原理与技术[M].北京:科学出版社,2001.601.
[4]　D.L斯佩克特,R.D.戈德曼,L.A.莱因万德.细胞实验指南[M].2002.1067-1068.
[5]　肖正华.改良的人体外周血淋巴细胞的培养与染色体标本的制作技术[J].第三军医大学学报,1994,16(6):450.