·专题研究1·

兴义维蚋蚋卵(胚胎)原代培养细胞核型分析*

周 静[1]，刘占钰[2]，徐 旭[3]，崔立秋[4]，陈汉彬[4]，杨 明[4]**
(1. 贵州医科大学 生物与工程学院，贵州 贵阳 550004；2. 赣南医学院第一附属医院 检验科，江西 赣州 341000；3. 贵州医科大学附院肝病实验室，贵州 贵阳 550004；4. 贵州医科大学 基础医学院，贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的**：分析兴义维蚋蚋卵(胚胎)原代培养细胞核型。**方法**：应用组织块法处理野外采集兴义维蚋蚋卵(胚胎)，以改良 Shields and Sang M3 为基础培养基，pH 6.0～6.5，置于 28 ℃生化恒温培养箱中进行原代细胞培养，选取 10 个处于有丝分裂增殖时期的细胞，通过秋水仙素处理，制作中期染色体标本，进行核型分析。**结果**：显微镜下观察，前中期染色体为 3 对($2n=6$)，染色体凝集程度未达最大化呈现长杆状，染色体长度为 9.43～13.58 μm；中期染色体为 3 对($2n=6$)，高度凝集呈现短杆状，染色体长度为 2.43～4.67 μm，两条中期染色体臂比值 <1.67，属中着丝粒染色体，4 条染色体臂比值 >1.67，属亚中着丝粒染色体。**结论**：初步阐析了兴义维蚋蚋卵(胚胎)原代培养细胞核型特征。

[关键词] 蚋科；兴义维蚋；胚胎；原代细胞；核型分析
[中图分类号] Q962；R384.5 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2016)11-1241-04
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.11.001

Karyotype Analysis of Primary Cells Cultured from Blackfly Eggs (Embryos) of *Simulium* (*Wilhelmia*) *xingyiense*

ZHOU Jing[1], LIU Zhanyu[2], XU Xu[3], CUI Liqiu[4], CHEN Hanbin[4], YANG Ming[4]
(*1. College of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical College, Gannan 341000, Jiangxi, China; 3. Liver Disease Laboratory, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. College of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To culture primary cells of blackfly eggs (embryos) and analyze their karyotype. **Methods**: The tissue block method was applied to treat the blackfly eggs (embryos) from *Simulium* (*Wilhelmia*) *xingyiense* that were collected in field. The blackfly eggs (embryos) were cultured in the modified Schneider's and Sang M3 medium at pH 6.0～6.5, and incubated in a biochemical incubator at 28 ℃. The primary cells in the mitotic and proliferative phase were selected and treated with colchicine, and their metaphase chromosomes were prepared for karyotype analysis. **Results**: The prometaphase chromosomes are 3 pairs($2n=6$), which were not aggregated at a maximum degree and showed themselves long rhabditiform, and the length of chromosome is 9.43～13.58 μm. Metaphase chromosome was 3 pairs ($2n=6$), and which were highly aggregated and showed themselves short rhabditiform, and the length of chromosome was 2.43～4.67 μm. Two metaphase chromosomes' arm ratio is less than 1.67, belonging tocentric chromosome, and the 4 chromosomes' arm ratio is more than 1.67, belonging to the submetacentric chromosome. **Conclusions**: The karyotype characteristics of

*[基金项目]国家自然科学基金(30660021)；贵州省社会发展科技攻关计划[黔科合(2012)3100]；贵州省科技计划项目[黔科合 LH 字(2016)7357]；贵州医科大学高等学校 2015 年大学生创新创业训练计划项目(201510660034)
**通信作者 E-mail：culex@gmc.edu.cn
网络出版时间：2016－11－15 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20161115.1757.021.html

primary cells cultured from the blackfly eggs (embryos) of *Simulium* (*Wi.*) *xingyiense* were preliminarily elucidated in this study.

[**Key words**] Simuliidae; *Simulium* (*Wilhelmia*) *xingyiense*; embryos; primary cells; karyotype analysis

蚋类,俗称黑蝇(blackflies),是一类小型驼背的双翅目吸血昆虫,可在人类和禽畜中传播盘尾丝虫病(onchocerciasis)、禽鸟住白细胞虫病(Leucocytozoonsis)和水泡性口炎(vesicular stomatitis)等,严重危害人类和禽畜的健康和安全,对蚋类生态习性的研究对蚋类的生物防治具有重要的理论和临床意义。迄今,全球已知现生的 2 151 蚋种中,研究人员已对 390 种进行了细胞学研究[1-2]。蚋类细胞通过有丝分裂确保遗传物质传递,使得细胞分化和组织发生得以实现,确保了蚋虫的生长发育。对于蚋类原代细胞染色体的核型分析,可以丰富蚋类遗传学知识体系,指导蚋类分类系统研究,并为蚋类细胞系建立提供鉴定依据[3]。目前,国外学者对蚋类染色体在形态分类中的作用进行了研究[4-6],国内学者主要对河南纺蚋、黑山水蚋和兴义维蚋等唾腺多线染色体进行研究[7-11],这些研究主要是通过组织标本进行蚋类染色体研究,而对于蚋类细胞有丝分裂增殖过程中染色体的核型研究尚无相关报道。本研究以贵州省贵阳市郊区兴义维蚋蚋卵(胚胎)为研究材料,在适宜的细胞培养基和培养条件下对蚋卵(胚胎)组织进行原代细胞培养,选取处于增殖生长旺盛时期的原代培养细胞,制备原代细胞前中期和中期染色体,进行核型分析,以期为蚋类细胞系鉴定奠定一定的理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料

用于原代细胞培养的组织均为蚋科前幼虫期卵块标本,从贵阳市郊区(花溪、羊昌、乌当)野外采集蚋卵(胚胎),未发育至前幼虫期蚋卵可经蚋类槽式循环饲养系统处理,待其发育至前幼虫期(肉眼为棕黑色,镜下通过透明卵壳可见红眼点出现,破卵器形成)[1],经鉴定为兴义维蚋后用于原代细胞培养。

1.2　方法

1.2.1　原代细胞培养及观察　将野外采集的蚋卵(胚胎)从卵阀上分离,无菌水清洗 4 ~ 5 次进行消毒前预处理;70% 乙醇浸泡 10 min,无菌水冲洗 2 ~ 3 次;1% 过氧乙酸浸泡 15 min,无菌水冲洗 3 ~ 4 次;2.8% NaClO 浸泡 5 min,无菌水冲洗 4 ~ 5 次[12]。将消毒好的蚋(卵)胚胎吸入 2 mL 离心管中,眼科剪剪碎,加入 1/2 体积的 0.25% 胰蛋白酶,27 ℃处理 10 min,纱布过滤,滤液 800 r/min,离心 5 min,去除上清,应用改良型 Shields and Sang M3(20% FBS、500 U/mL 青霉素、500 mg/L 硫酸链霉素、12.5 mg/L 两性霉素 B、5 mg/L 胰岛素)细胞培养基悬浮组织细胞并计数,按 1×10^5 个/mL,接种于经多聚赖氨酸 (PLL) 处理一次性塑料培养皿中,置于 28 ℃生化恒温培养箱中培养。组织细胞悬液接种后,根据细胞生长情况,进行 1/2、1/3 及 1/4 部分换液,倒置显微镜下定期观察组织细胞的贴壁情况及细胞的迁移、增殖状态,并拍照分析。

1.2.2　原代细胞染色体制备　选取处于有丝分裂增殖期的原代培养细胞,秋水仙素培养处理 5 ~ 6 h,KCl 低渗处理 2 次,Carnoy's 固定液固定后置于载玻片上,姬姆萨染色,中性树胶封片。在 40 倍物镜下寻找背景干净、染色体分散较好的有丝分裂相,在 100 倍物镜下 CCD 获取染色体图像。选取染色体分散较好的 10 个分裂相细胞,进行染色体计数,测量染色体的长度,计算臂比值,对染色体进行分类[13]。统计分析各条染色体的相对长度,根据相对长度对染色体进行列队,排出核型图,进行核型分析[14-16]。

2　结果

2.1　原代细胞培养

根据细胞生长情况,定期对原代培养细胞进行换液处理。蚋卵(胚胎)组织块接种 12 h 后,组织细胞贴壁生长;培养 1 周,大量细胞从组织块周围脱落迁移生长。培养 3 周,可见圆形细胞有丝分裂为两个子代细胞(图 1A),细胞增殖较为明显(图 1B)。该时期细胞增殖活跃,可作为蚋卵(胚胎)原代细胞核型分析材料。

2.2 核型分析

选取染色体分散较好的前中期或中期分裂相细胞共 10 个进行拍照,显示前中期染色体为 3 对($2n=6$),按照染色体长度进行编号排序,3 对染色体分别以 $Ⅰ_1$、$Ⅰ_2$,$Ⅱ_1$、$Ⅱ_2$,$Ⅲ_1$、$Ⅲ_2$ 进行编号,该期染色体长度为 9.43 ~ 13.58 μm(表 1)。中期染色体染色体为 3 对($2n=6$),染色体编号与前中期相同,该期染色体长度为 2.43 ~ 4.67 μm,臂比值结果显示 2 条染色体为中着丝粒染色体,4 条染色体为亚中着丝粒染色体(表 2)。蚋卵(胚胎)原代细胞染色体核型模式图显示:前中期染色体未达最大化凝集呈现长杆状(图 2A),染色体数目 2n = 6,按照染色体长度进行编号排序(图 2B);中期染色体高度凝集呈现短杆状(图 3A),按照臂比值可划分为中着丝粒和亚中着丝粒染色体,并对其进行编号排序,其中中着丝粒染色体 2 条、占总染色体数目的 1/3,亚中着丝粒染色体 4 条、占总染色体数目 2/3(图 3B)。

表 1　兴义维蚋蚋卵前中期染色体长度

Tab. 1　The measurement of prometaphase chromosomes of *Simulium*(*Wilhelmia*) *xingyiense*

染色体编号	前中期染色体长度(μm)
$Ⅰ_1$	13.58
$Ⅰ_2$	13.46
$Ⅱ_1$	11.25
$Ⅱ_2$	10.47
$Ⅲ_1$	9.57
$Ⅲ_2$	9.43

表 2　兴义维蚋蚋卵中期染色体绝对长度、相对长度、臂比值、染色体类型($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2　The statistics of metaphase chromosome of *Simulium* (*Wilhelmia*) *xingyiense*

染色体编号	中期染色体			
	绝对长度(μm)(p+q)	相对长度(p+q)/(Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ)	臂比值(q/p)	染色体类型
$Ⅰ_1$	3.727 ±0.950	0.195 ±0.002	1.055 ±0.036	M
$Ⅰ_2$	3.662 ±0.101	0.192 ±0.003	1.104 ±0.131	M
$Ⅱ_1$	3.314 ±0.138	0.173 ±0.004	1.685 ±0.100	SM
$Ⅱ_2$	3.236 ±0.121	0.169 ±0.004	1.697 ±0.159	SM
$Ⅲ_1$	2.636 ±0.125	0.138 ±0.005	1.721 ±0.118	SM
$Ⅲ_2$	2.545 ±0.112	0.133 ±0.003	1.778 ±0.104	SM

注:p 为短臂,q 为长臂,M 为中央着丝粒,SM 为亚中央着丝粒

3　讨论

昆虫核型分析是对细胞前中期和中期染色体数目、大小、形态等特征的分析研究[17]。对于遗传疾病机制、物种亲缘关系与进化,远缘杂种的鉴定具有重要意义,同时也是建立细胞系时对不同物种来源细胞系鉴定的最佳方法[18-20]。

蚋类核型分析是蚋类遗传防治和蚋类分类鉴定的重要实验方法,本研究主要通过兴义维蚋蚋卵(胚胎)原代细胞培养,选取细胞增殖过程中处于有丝分裂旺盛时期的原代细胞制作染色体,进行核型分析。研究结果显示兴义维蚋前中期和中期染色体数目均为 3 对($2n=6$),中期染色体高度凝集长度在 4 μm 左右,Ⅰ号染色体具中央着丝粒,Ⅱ和Ⅲ号染色体均为亚中央着丝粒(图 3)。与黄丽等[10]制备兴义维蚋唾腺多线染色体数目 $2n=6$ 相一致。兴义维蚋多线染色体是唾腺细胞中多股染色单体平行排列形成一种缆状巨大染色体,长度在 20 μm左右[8]。

本研究主要是展示了蚋类原代细胞有丝分裂过程中前中期和中期染色体核型特征,一方面可协助分子分类鉴定培养细胞的种属来源;另一方面,完善了蚋类原代细胞培养的历史档案,便于与后期建成的细胞系的核型特征进行比较分析。不同蚋种来源细胞中期染色体在数量上较恒定($2n=6$)。但对于不同蚋种细胞中期染色体大小、形态及带型上的差异及规律还有待进一步探索研究。

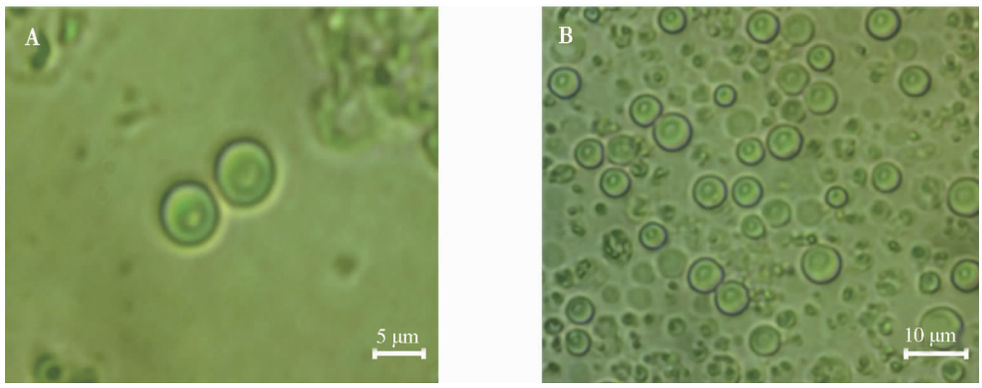
4　参考文献

[1] 陈汉彬,张春林,杨明,等. 中国蚋科昆虫[M]. 贵阳:贵州科技出版社, 2016:104 - 109.

[2] 张礼生,张青文,蔡青年,等. 中国昆虫染色体研究现状与展望[J]. 昆虫学报, 2003(6):773 - 782.

[3] Peter HA, ümit DS. A new species of black fly in the Prosimulium hirtipes (Fries) group (Diptera: Simuliidae) from western turkey[J]. Proc Entl Socie Washi, 2015(2):85 - 94.

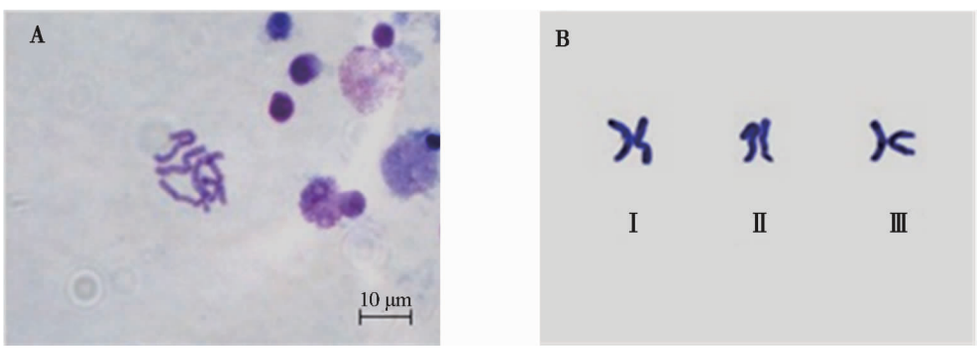
[4] Antonios AA, Elena D, Aggeliki GP, et al. Cytogenetic and symbiont analysis of five members of the B. dorsalis complex (Diptera, Tephritidae): no evidence of chromosomal or symbiont-based speciation events[J]. ZooKeys, 2015(540):273 - 298.



注:A 为两个有丝分裂子代细胞,B 为多个有丝分裂子代细胞

图 1　蚋卵(胚胎)原代细胞增殖生长

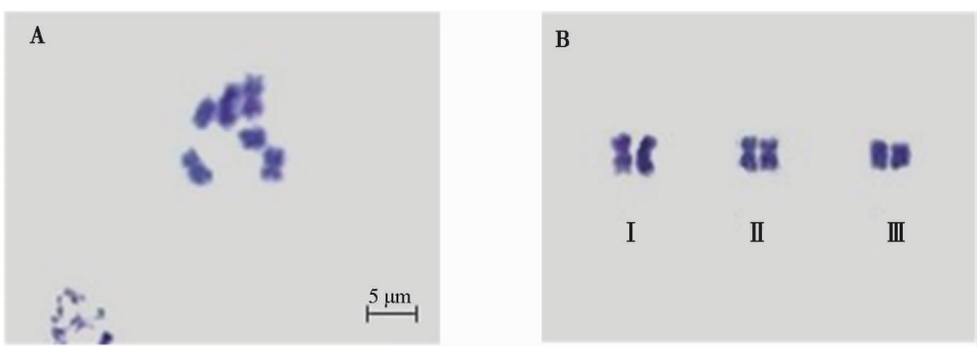
Fig. 1　The proliferation and growth of primary cell of blackfly eggs (embryos)



前中期染色体　　前中期染色体核型

图 2　兴义维蚋蚋卵前中期染色体及核型分析

Fig. 2　The prometaphase chromosomes and karyotype analysis



中期染色体　　中期染色体核型

图 3　兴义维蚋蚋卵中期染色体及核型分析

Fig. 3　The metaphase chromosomes and karyotype analysis

[5] Chubareva LA, Kachvorian EA. Morphological and karyotypic analysis of five blackflyspecies of the genus Cnetha (Diptera: Simulidae): description of the novel species from the canyon in Armenia [J]. Parazitologiia, 2000 (6):470 – 476.

[6] Chubareva LA. A karyotypic analysis of 2 species of blackflies in the genus Prosimulium (Diptera: Simuliidae) from the Kola Peninsula and Kamchatka [J]. Parazitologiia, 2000(4):288 – 294.

[7] 温小军,韦静,陈汉彬. 河南纺蚋多线染色体研究[J]. 四川动物, 2007(3):525 – 527.

(下转第 1248 页)

2003(3): 313 – 321.
[5] 闫娇, 姜丽, 郭琴,等. DNA 条码技术在双翅目昆虫中的应用[J]. 天津师范大学学报, 2015(3): 66 – 72.
[6] 梁亮, 江威, 余慧,等. 中国果实蝇属种类的 DNA 条形码鉴定(双翅目:实蝇科)[J]. 动物分类学报, 2011(4): 925 – 932.
[7] 潘程莹, 胡婧, 张震等. 斑腿蝗科 Calantopidae 七种蝗虫线粒体 *CO* Ⅰ基因的 DNA 条形码研究[J]. 昆虫分类学报, 2006(2): 103 – 110.
[8] Li YW, Zhou X, Feng G, et al. *COI* and ITS2 sequences delimit species, reveal cryptic taxa and host specificity of fig-associated *Sycophila* (Hymenoptera, Eurytomidae)[J]. Mol Ecol Resour, 2010(1): 31.
[9] Rach J, DeSalle R, Sarkar IN, et al. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata[J]. Proc Biol Sci, 2008(2): 237 – 247.
[10] Conceição PA, Crainey JL, Almeida TP, *et al*. New molecular identifiers for *Simulium limbatum* and *Simulium incrustatum* s. l. and the detection of genetic substructure with potential implications for onchocerciasis epidemiology in the Amazonia focus of Brazil[J]. Acta Trop, 2013(2): 118 – 125.
[11] Conflitti IM, Pruess KP, Cywinska A, et al. DNA barcoding distinguishes pest species of the black fly genus *Cnephia* (Diptera: Simuliidae)[J]. J Med Entomol, 2013(6): 1250 – 1260.
[12] Day JC, Goodall TI, Post RJ. Confirmation of the species status of the blackfly *Simulium galeratum* in Britain using molecular taxonomy[J]. Med Vet Entomol, 2008(1): 55 – 61.
[13] Bernotien R, Stun NAS V. On the biology of *Simulium galeratum* in Lithuania ecological and molecular data[J]. Ekologija, 2009(2): 123 – 126.
[14] 罗洪斌, 杨明, 陈汉彬. 克隆医学昆虫蚋 *CO* Ⅰ全基因的引物设计方法探讨[J]. 湖北民族学院学报:医学版, 2008(3): 12 – 14.
[15] Ratnasingham S, Hebert PDN. BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org)[J]. Mol Ecol Notes, 2007(3): 355 – 364.
[16] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. J Mol Evol, 1980(2):111 – 120.
[17] Tamura K., Stecher G., Peterson D, *et al*. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Mol Biol Evol, 2013(12): 2725 – 2729.
[18] Adler PH, Crosskey RW. World blackflies (Diptera: Simuliidae): A comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory[M]. Clemson: Clemson University, 2016:1 – 126.

(2016-08-01 收稿,2016-11-03 修回)
中文编辑: 刘　平; 英文编辑: 刘　华

(上接第 1244 页)

[8] 张建庆,张春林,陈汉彬,等. 黑水山蚋的唾腺多线染色体研究[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2008(2):96 – 102.
[9] Huang L, Zhang CL, Jiang YH, et al. Polytene chromosomes of *Simulium* (*Wilhelmia*) *xingyiense* (Diptera: Simuliidae) from China[J]. Acta Entomol Sin, 2012(8):988 – 993.
[10] 黄丽,张春林,黄若洋,等. 黔蚋唾腺多线染色体研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012(5):354 – 356.
[11] 温小军,韦静,陈汉彬. 五条蚋两地理株多线染色体比较研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007(3):253 – 255.
[12] 周静,陈汉彬,杨明. 几种消毒剂对蚋卵原代细胞培养效果的比较[J]. 贵阳医学院学报, 2010(4):334 – 340.
[13] 翟中和,王喜忠,丁明孝. 细胞生物学[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社, 2007:343 – 354.
[14] Altlnordu F, Peruzzi L, Yu Y, et al. A tool for the analysis of chromosomes: KaryoType[J]. Taxon, 2016(3): 586 – 592.
[15] Prosanta S, Debabrata S, Avijit K, et al. Karyotype analysis and chromosomal evolution in Asian species of Corchorus (Malvaceae s. l.)[J]. Gene Reso Crop Evo, 2014(6):1173 – 1188.
[16] 余蕾,杨国珍,王碧,等. 贵阳地区染色体疾病儿童的染色体核型分析[J]. 贵州医科大学学报, 2015(11): 1170 – 1175.
[17] Robert B, Angus, Teresa C, et al. A chromosomal analysis of eleven species of Gyrinidae (Coleoptera)[J]. Comp Cytogen, 2016(1):189 – 202.
[18] Al-Qahtani AH, Al-Khalifa MS, Al-Saleh AA. Karyotype, Meiosis and sperm fomation in the red palm Weevil Rhynchophorus ferrugineus[J]. Cytologia, 2014(2): 235 – 242.
[19] Wagner FM, Pablo AM, Luiz AC. et al. Evidence for meiotic drive as an explanation for karyotype changes in fishes[J]. Mar Genomics, 2014(15):29 – 34.
[20] Beatriz V, Doris B. Numerous transitions of sex chromosomes in diptera[J]. PLOS Biol, 2015(4):1 – 22.

(2016-07-30 收稿,2016-11-11 修回)
中文编辑: 周　凌; 英文编辑: 刘　华