

文章编号: 1001-1498(2007)04-0551-05

# 五种双翅目昆虫细胞系染色体分析

张欣, 冯颖\*, 马涛, 马艳, 丁伟峰

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224)

**摘要:**采用直接法制备传代细胞染色体标本、常规 Giemsa 染色、显微镜下计数中期分裂相染色体数目的方法对 5 个双翅目昆虫细胞系进行了染色体分析。结果显示: C6/36 染色体众数为 6, 为二倍体细胞系; SL2 染色体众数为 8 ~ 12, 超二倍体细胞系; L-2/M delta 2-3 染色体众数为 8 ~ 20, 超二倍体细胞系; *Aedes albopictus* Skuse 染色体众数为 6, 为二倍体细胞系; NH-SaPe-4 染色体众数为 10 条, 为二倍体或亚二倍体细胞系。与来源细胞相比, 以上 5 种细胞染色体数目没有发生根本性的改变。

**关键词:**双翅目; 细胞系; 染色体; 核型

中图分类号: S763

文献标识码: A

## The Chromosome Analysis of 5 Diptera Insect Cell Lines

ZHANG Xin, FENG Ying, MA Tao, MA Yan, DING Wei-feng

(1. Research Institute of Resource Insects, CAF; Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resource Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** The Chromosome analysis of 5 Diptera insect cell lines was made by direct method, with regular Giemsa staining. Chromosomes of these cells in metaphase were counted under the microscope. The chromosome numbers and their nuclear types were analyzed. C6/36 belonged to diploid cell lines and its chromosome mode was 6. SL2 belonged to hyperdiploid cell lines and its chromosome mode range was 8 ~ 12. L-2/M delta 2-3 belonged to hyperdiploid cell lines and its chromosome mode range was 8 ~ 20. *Aedes albopictus* Skuse belonged to diploid cell lines and its chromosome mode was 6. NH-SaPe-4 belonged diploid or hypodiploid cell lines and its chromosome mode was 10. Chromosome numbers in the 5 cell lines were not completely changed.

**Key words:** Diptera; cell lines; chromosome; karyotype

自 20 世纪 60 年代建立了第一个能够稳定传代的昆虫细胞系以来, 经过几十年的研究和发展, 昆虫细胞培养已在细胞系建立、培养技术和方法、昆虫细胞培养技术的利用等方面取得了很大的进展, 由于昆虫细胞系与细胞培养技术在很多方面体现出了重要的研究和应用价值, 被广泛地应用于分子及细胞生物学研究中<sup>[1]</sup>。特别是自 Smith 等<sup>[2]</sup>创建了昆虫杆状病毒表达系统以来, 昆虫杆状病毒作为一种安

全、高效的表达载体被广泛应用, 从而使昆虫细胞培养倍受青睐。近年来, 由于昆虫细胞大规模培养、昆虫杆状病毒表达系统、生物杀虫剂、抗菌肽等的研究和发展, 昆虫细胞作为昆虫生理生化研究、生物反应器以及表达基因产物等的重要研究工具, 更是受到越来越广泛及深入的研究和利用<sup>[3]</sup>。

目前, 对昆虫细胞培养的研究涉及到昆虫细胞生物学特性、昆虫细胞培养基、细胞冻存、污染及应

收稿日期: 2007-02-28

基金项目: 国家林业局“948 项目“昆虫细胞系及细胞库建立技术引进”(2002-52)

作者简介: 张欣(1981—), 女, 云南彝良人, 硕士。

\* 通讯作者

用等方面。细胞形态、细胞生长特性及细胞核型等细胞的生物学特性是昆虫细胞培养的重要特征。细胞系的生物学特性很大程度依赖于其遗传稳定性<sup>[4]</sup>;体内细胞的遗传学性状是稳定的,而在离体培养过程中却很容易发生改变。因此,一般认为培养细胞的染色体特征不能作为细胞系的分类学特征,但由于其生物学特征是影响细胞生长及应用的主要因素,所以检测细胞学遗传特征是体外培养细胞的一项重要指标<sup>[5]</sup>。昆虫细胞系建立后染色体是否异倍化是该细胞系的生物学特征之一,就这方面来看,鳞翅目昆虫细胞系的染色体研究较多,研究表明,培养的鳞翅目昆虫细胞染色体异倍化严重<sup>[6-8]</sup>,而双翅目昆虫细胞的染色体研究较少,文中对 5 种来源于双翅目的昆虫细胞系进行了染色体分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试细胞系 C6/36(来源于白纹伊蚊 *Aedes albopictus* Skuse 新孵幼虫); SL2(来源于黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Fallen 胚胎); L-2/M delta 2-3(来源于黑腹果蝇胚胎); *Aedes albopictus* Skuse(来源于白纹伊蚊新孵幼虫); NH-SaPe-4(来源于麻蝇 *Sarcophaga peregrine* Rob Desvoidy 成虫卵巢内发育成胚);以上细胞均由中国林业科学研究院资源昆虫研究所保存。

1.1.2 主要试剂 秋水仙素溶液:  $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;低渗 KCl 溶液的质量分数:分别为 0.50%、0.58%和 0.65%;Camoy 氏固定液:甲醇:冰醋酸 = 3:1;磷酸缓冲液:  $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ 和  $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ 按 4:1 混合;Giemsa 染料:1 份 Giemsa 原液和 10 份磷酸缓冲液混合;香柏油。

### 1.2 染色体分析方法

1.2.1 终止培养 培养细胞至对数生长期,加入占培养基总体积 1/10 的  $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素混匀,继续培养 4~5 h。

1.2.2 低渗处理 收集细胞,150 g 下离心 5 min,弃上清;分别轻轻加入 7 mL 的 0.50%~0.65%的低渗 KCl 液,在室温下处理 15 min,150 g 下离心 5 min,弃上清。

1.2.3 固定 使细胞沉淀重悬于 1 mL 低渗 KCl 溶液中,加入 1 mL 的新鲜固定液(要与细胞悬液相同体积)混匀,再轻轻的加入 6 mL 固定液,混匀固定 15 min,150 g 下离心 5 min,弃上清。

1.2.4 重复固定 加入 7 mL 固定液,混匀,室温下固定 15 min,150 g 下离心 5 min,弃上清。

1.2.5 制片 用少量的固定液(0.1~0.3 mL,应依照细胞的多少来加)混匀细胞,从高处滴细胞悬液至干净的载玻片上,室温下自然干燥。

1.2.6 染色 吉姆萨染液染 10~15 min,流水冲洗,风干镜检。

1.2.7 观察与分析 在油镜下选择 100 个分散良好的细胞,使用 M50 软件系统拍照保存;并利用测微尺及电子计数器进行统计、分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 C6/36

记数 100 个中期分裂相 C6/36 细胞染色体,其染色体数目变动范围为 6~26,细胞染色体数目主要集中在分布于 5 个值,染色体数目为 6 条的细胞占观察细胞总数的 65% (图 1)。从染色体特征上看,染色体染色后在显微镜下观察为深紫色,长杆状,缢痕明显,相对长度一般为 2~10  $\mu\text{m}$ ,在染色体中部的上方能观察到缢痕,为亚中部着丝粒染色体,体现出的常是早中期的染色体。在染色体数目为 6 的细胞中,其中的 4 条染色体个体较大,相对长度在 8  $\mu\text{m}$  左右,而另外 2 条染色体较小,相对长度在 4  $\mu\text{m}$  左右(图版 1)。

根据温小军等<sup>[9]</sup>的研究,同属的 3 种伊蚊 *Aedes meigen* 的染色体数目均为  $2n=6$ 。细胞系 C6/36 经多次传代培养后,65% 的细胞染色体数目为 6 条,细胞染色体中位数为 6,众数为 6,说明 C6/36 为二倍体细胞系。

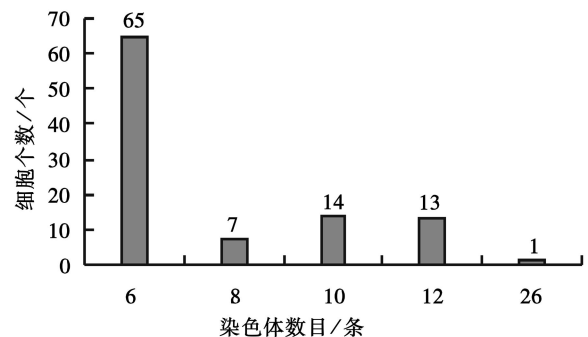


图 1 C6/36 细胞染色体数目分布

### 2.2 SL2

记数 100 个中期分裂相 SL2 细胞染色体,其染色体数目变动范围为 4~21,细胞染色体数目集中分布于 10 个值,染色体数目在 8~12 条的细胞占观

察细胞总数的 92% (图 2)。在显微镜下观察,SL2 细胞染色体染色后为紫色,染色体个体较大,从染色体特征上看,染色体形态呈杆状,呈现长细型和短粗型 2 种形态,能分清 2 条姐妹染色体,缢痕明显。相对长度一般为 3~9  $\mu\text{m}$ ,在染色体中部能观察到缢痕,为中部着丝粒染色体,体现出的常是中期的染色体,染色体为 2 条染色单体构成的叉状形状 (图版 2)。

据王转斌<sup>[10]</sup>的研究,果蝇属 *Drosophila* 的染色体数目为  $2n=8$ ,研究发现细胞系 SL2 染色体中位数为 10,众数为 8~12,92% 细胞染色体数目为 8~12 条;说明 SL2 细胞系为超二倍体细胞系。观察发现,个别细胞中的染色体大约只有正常染色体的一半大,着丝粒在端部,有可能为 B 染色体<sup>[11]</sup>,这种染色体在果蝇的有丝分裂中期核型中也有出现<sup>[12]</sup>。结果说明 SL2 细胞在成系后,染色体的数目没有发生特别大的改变,但也存在着多倍化的现象。

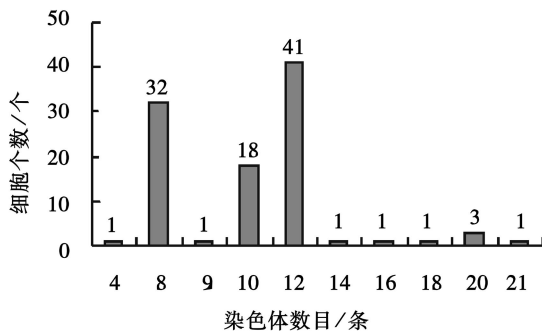


图 2 SL2 细胞染色体数目分布

### 2.3 L-2/M delta 2-3

记数 100 个中期分裂相 L-2/M delta 2-3 细胞系染色体,其染色体数目变动范围为 5~22,细胞染色体数目集中分布于 10 个值;染色体数目在 8~20 条的细胞占观察细胞总数的 95% (图 3);在显微镜下观察,L-2/M delta 2-3 细胞染色体染色后为兰紫色,染色体个体较大,相对长度一般为 3~10  $\mu\text{m}$ ,与 SL2 细胞系类似,L-2/M delta 2-3 染色体也出现长细型和短粗型 2 种形态,其中长细型占大多数。从染色体特征上看,染色体形态呈杆状,能分清 2 条姐妹染色体,在染色体中部能观察到明显缢痕,为中部着丝粒染色体,体现出的常是中期的染色体,染色体为 2 条染色单体构成的叉状形状 (图版 3)。

黑腹果蝇的染色体数目为  $2n=8$ <sup>[10]</sup>,L-2/M delta 2-3 细胞染色体中位数为 10,众数为 8~20;说明 L-2/M delta 2-3 细胞系为超二倍体细胞系。在形态

方面也能观察到少数个体较小且着丝粒在端部的 V 字型 B 染色体,说明该细胞在培养成系后核型也没有完全改变。

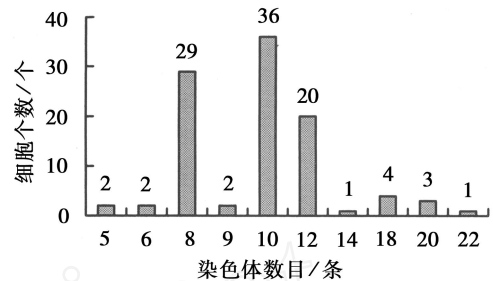


图 3 L-2/M delta 2-3 细胞染色体数目分布

### 2.4 Aedes albopictus Skuse

记数 100 个中期分裂相 *Aedes albopictus* Skuse 细胞染色体,其染色体数目变动范围为 6~12,细胞染色体数目较恒定,集中分布于 4 个值,染色体数目 6 条的细胞占观察细胞总数的 95% (图 4)。在显微镜下观察颜色较深,为深紫色。从染色体特征上看,染色体形态呈长杆状,相对长度为 3~8  $\mu\text{m}$ ,在染色体中上部能观察到明显的缢痕,为亚中部着丝粒染色体 (图版 4)。

张财兴<sup>[13]</sup>等利用同种昆虫白纹伊蚊幼虫脑神经节进行染色体研究,其染色体数目为 6 的占 81.88%。该研究发现 *Aedes albopictus* Skuse 细胞系的染色体中位数为 6,众数为 6, $2n=6$  的细胞占观察细胞总数的 95%;说明该细胞在培养成系后核型几乎没有改变,为二倍体细胞系。

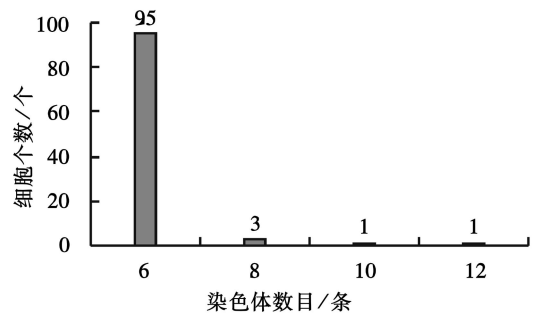


图 4 *Aedes albopictus* Skuse 细胞染色体数目分布

### 2.5 NIH-SaPe-4

记数 100 个中期分裂相 NIH-SaPe-4 细胞染色体,染色体数目变动范围为 10~20,细胞染色体数目较恒定,主要集中分布于 3 个值,染色体数目在 10 条的细胞占观察细胞总数的 86% (图 5)。在显微镜下观察 NIH-SaPe-4 细胞染色体染色后为兰紫色,染色体形态呈杆状,染色体个体较大,几乎为长杆状,

相对长度一般为  $3 \sim 8 \mu\text{m}$ ; 在染色体中部的上方能观察到明显的缢痕, 为亚中部着丝粒染色体; 个别细胞的染色体能分清其 2 条染色单体 (图版 5)。

目前, 未见麻蝇属昆虫染色体研究的报道, 傅荣典<sup>[14]</sup>等对同科亚麻蝇属 *Panasarophaga* 7 个种昆虫的核型进行了研究, 亚麻蝇属昆虫染色体数目为  $2n = 12$ , 该研究发现 NTH-SaPe-4 细胞系的染色体大部分为 10, 部分染色体易成对分布, 由此分析该细胞系为亚二倍体或二倍体细胞系。

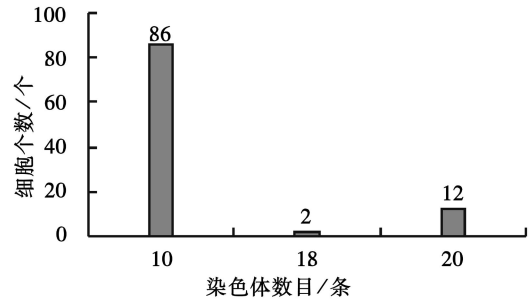
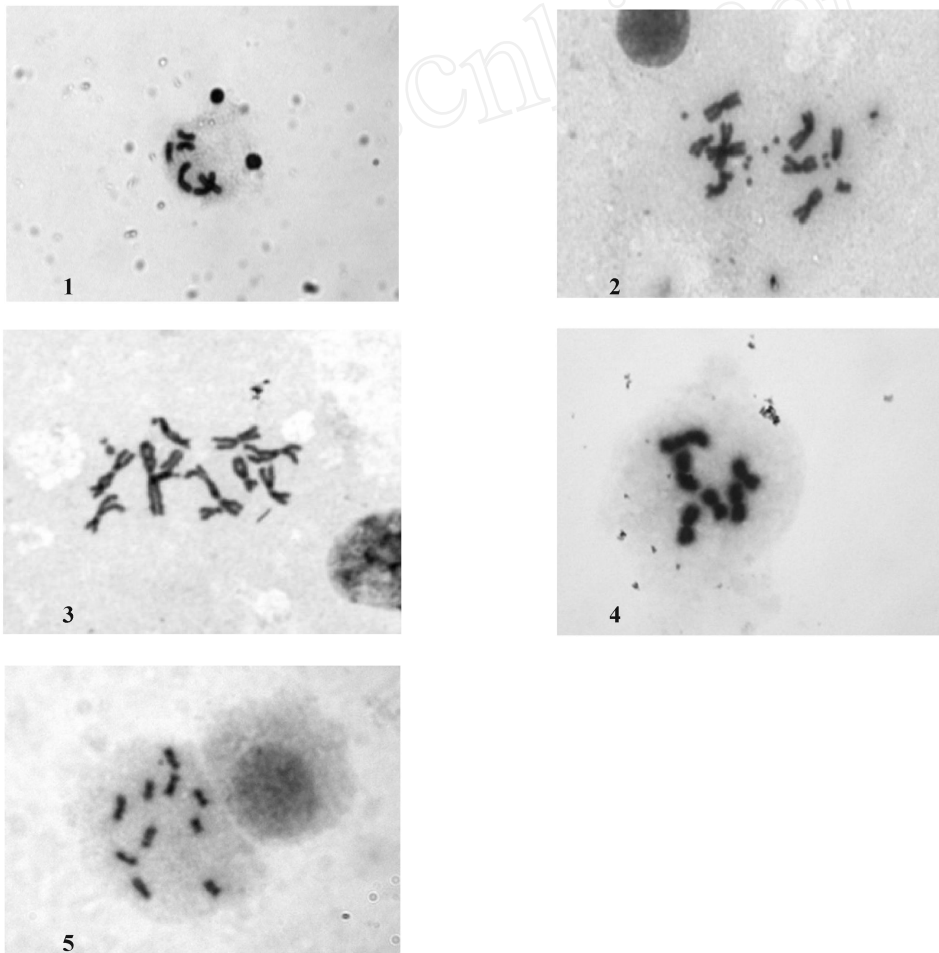


图 5 NTH-SaPe-4 细胞染色体数目分布



图版说明: 1: C6/36 细胞染色体; 2: SL2 细胞染色体;

3: L-2/M delta 2-3 细胞染色体; 4: *Aedes albopictus* Skuse 细胞染色体; 5: NTH-SaPe-4 细胞染色体。

### 3 讨论

细胞的增殖是建立在细胞分裂的基础上, 在细胞分裂过程中, 染色体发生着一系列的变化, 染色体的组成和变化必然对细胞分裂产生或多或少的影响。由于离体环境下不稳定的因素增加, 使体外培养细胞的突变率很高。在长期人工制造的生长条件下, 培养基、温度、氧气及 pH 值的变化都可能使细

胞产生一些不规律的变异。所以经过离体培养的细胞, 染色体一定都存在变化<sup>[15,16]</sup>, 且细胞染色体的变异率还随着传代次数的增加而增大<sup>[17]</sup>。

研究表明, 体外培养的昆虫细胞也存在染色体的变异, 并且长期离体培养的昆虫细胞往往易出现异倍化的现象<sup>[18]</sup>, 几乎所有的鳞翅目昆虫细胞染色体也表现出变异程度很大的特征, 而双翅目昆虫细胞染色体的变异却不十分明显<sup>[19]</sup>。据报道, 白蚊伊

蚊细胞系 Aa-778 中 74% 以上的细胞为二倍体,中华按蚊 *Anopheles sinensis* Wiedemann 细胞系 As-684 也是以二倍体细胞为主<sup>[19]</sup>;潘李珍<sup>[20]</sup>等对其建立的中华按蚊细胞系进行 2 个不同代细胞(9 代,21 代)的核型分析,结果显示绝大部分细胞是二倍体;Felio<sup>[21]</sup>等建立的 *Psorophora confinnis* Lynch-Arribalza 细胞系第 62 代细胞也大部分为二倍体细胞,Gloria<sup>[22]</sup>等对其建立的 *Lutzomyia longipalpis* Lutz 细胞系从传代初期到成系后进行了多次核型分析,研究显示 85% 的细胞为二倍体细胞。

本文研究的 5 种双翅目细胞系均经过了无限次传代,细胞离体生长时间较长,染色体分析发现,其染色体数目较为恒定,常集中分布于几个数目,且主要分布大多数与其来源的昆虫染色体的数目保持一致,其大多数细胞的核型特征为二倍体,少数为三倍体或四倍体,只有极少数的为异倍体或多倍体。染色体缢痕也较为明显,多为杆状的中部着丝粒染色体或亚中部着丝粒染色体。文中研究的 5 个双翅目细胞系和已报道的 5 个细胞系染色体多为二倍体,这些数量及形态特征说明双翅目昆虫细胞在长期的离体培养环境中,遗传物质并没有发生根本性的改变。由此分析,双翅目昆虫细胞系的核型特征可以作为细胞系分类学特征之一。这与鳞翅目昆虫细胞系的核型特征差异较大,鳞翅目昆虫细胞系染色体变异大,异倍化严重,染色体多为点状和短杆状<sup>[23~25]</sup>,因此其核型特征一般不能作为细胞系分类学特征。为什么同是昆虫细胞系,在染色体变异上却存在这么大的差异,还有待于进一步的研究;但双翅目昆虫细胞系所表现出来的染色体特征可为研究和应用双翅目昆虫细胞系及其来源昆虫提供有益的参考。

## 参考文献:

- [1] 宋德伟,马艳,冯颖,等.昆虫细胞工程进展[J].林业科学研究,2004,17(1):116~124
- [2] Smith G E Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector[J].Mol Cell Biol,1983,3:183~192
- [3] Karl Maramorosch 昆虫细胞系的发展:历史回顾[J].武汉大学学报,1992(4):30~32
- [4] 马志敏,金成娥,任志华,等.传代培养角膜细胞的染色体遗传变异率分析[J].上海交通大学学报(医学版),2006,20(1):76~77
- [5] 鄂征.组织培养和分子细胞学技术[M].北京:北京出版社,1999:164~172
- [6] 洪鹰,曾庆涛,嗜凤梨果蝇 (*Drosophila ananassae*) 细胞系的建立及其生物学特性初步观察[J].湖北大学学报(自然科学版),2003,25(2):144~147
- [7] 李长友,郑桂玲,王晓云,等.八字地老虎血球细胞系的建立[J].昆虫学报,2002,45(2):279~282
- [8] 陈曲候,麦克塔希,伊格洛佛.黄条行军虫 (*Spodoptera omithogalle*) 两个传代细胞系的建立[J].华中师院学报,1984(3):101~108
- [9] 温小军.中国三种伊蚊的核型分析[J].贵阳医学院学报,2000,25(3):224~225
- [10] 王转斌.果蝇的保存技巧及唾液腺染色体的制备[J].实验技术与管理,2002,19(3):37~39
- [11] 李国珍.染色体及其研究方法[M].北京:科学出版社,1985:18~19
- [12] 钱远槐,张菁,薛小桥.银额果蝇武汉群体的 B 染色体研究[J].遗传,1995,17(4):19~20
- [13] 张财兴,戎可.厦门蚊虫染色体研究[J].厦门大学学报(自然科学版),1994,33(3):404~408
- [14] 傅荣典,庞万敏,傅文庆.野亚麻蝇 (*Parasarcophaga similis*) 有丝分裂中期核型研究[J].福建师范大学学报(自然科学版),1989,5(4):77~81
- [15] 陈敏容,陈宏溪,易咏兰.鲫鱼异倍体细胞系的建立及其生物学特性[J].水产学报,1985,9(2):121~130
- [16] Yuanan Lu, Luanan C N, Rohovec J S, et al Establishment and characterization of three new cell lines from grass carp [J]. In Vitro Cell Dev Biol,1990,26(3):275~278
- [17] 沈锦玉,尹文林,曹铮,等.鳙鱼吻端细胞系 BHS 的建立及特性观察[J].浙江水产学院学报,1993,12(4):265~270
- [18] 周亚亮,张志芳,何家禄.家蚕悬浮培养细胞系的建立及悬浮培养[J].蚕业科学,2000,26(1):34~37
- [19] 陈晓虹,陈广文.我国已建立的昆虫细胞系及其生物学特性与应用[J].昆虫知识,1999,36(4):233~238
- [20] 潘李珍,石梦辉,张漪,等.中华按蚊 (*Anopheles sinensis*) 细胞系的建立和特征[J].细胞生物学杂志,1989,11(2):78~82
- [21] Felio J B, Jaime A R, Jesus E, et al A new continuous cell line from the mosquito *Psorophora confinnis* (Diptera: Culicidae) and its susceptibility to infection with some arbovirus [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2001, 96: 1~8
- [22] Gloria J R, Cristina F, Felio J B. Establishment and characterization of a new continuous cell line from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its susceptibility to infections with arboviruses and *Leishmanis chagasi* [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1999(26): 1~9
- [23] 麦克塔希,伊格洛佛,陈曲候,等.棉铃虫 *Heliothis amigeru* Hbn 一个新细胞系的建立[J].华中师范学报,1983(1):97~98
- [24] 潘敏会,肖仕全,洪锡钧,等.家蚕胚胎细胞系 BmE-SWU1 的建立及其生物学特征[J].细胞生物学杂志,2005,27(6):708~712
- [25] Guoxun Li, Hongchun Yu, Jie Song. New Cell Line From Embryos of *Mythimna Separtata* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Entomologia Sinica, 1998, 5(1): 89~94