

文章编号: 1001-1498(2008)04-0493-07

7种鳞翅目昆虫细胞系染色体分析

张欣, 冯颖*, 丁伟峰, 马涛, 马艳

(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 7 种鳞翅目昆虫细胞系进行了染色体分析, 得出了各种细胞系染色体分析所需要的秋水仙素浓度与处理时间以及低渗浓度和处理时间的范围; 7 种鳞翅目细胞系染色体均表现出典型的鳞翅目昆虫传代细胞的核型特征: 染色体数目众多, 异倍化严重, 多为弥散型的着丝粒的短杆状、颗粒状、点状或圆球状。

关键词:鳞翅目; 细胞系; 染色体; 核型; 异倍化

中图分类号: Q996 **文献标识码:** A

The Chromosome Analysis of 7 Insect Cell Lines from Lepidoptera

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

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

Abstract: The chromosomes of 7 insect cell lines from Lepidoptera were analysed. The results showed that the favorable treated concentration and time of colchicines solution and hypotonic KCl solution for each cell line, and the chromosomes of the 7 Lepidoptera cells displayed the typical karyotype characteristics of Lepidoptera cell lines: these cells had a great variation in chromosome number, and had deeply heteroploid, chromosomes with diffuse centromeres were short pole-like, pellet-like and sphere-like.

Key words: Lepidoptera; cell lines; chromosome; karyotype; heteroploid

近年来,昆虫细胞培养技术作为现代实验生物学的重要手段之一,被广泛地应用于医学、农业及生物学的各个方面^[1-2]。特别是自 Smith 等^[3]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。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^[4]。然而,对昆虫细胞染色体及细胞的有丝分裂等生物学的研究却并不

多见,这些研究的滞后阻碍了对昆虫细胞的进一步研究和应用^[5]。

细胞系的生物学特性很大程度依赖于其遗传稳定性^[6];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,而作为转基因载体或表达载体必须对其染色体和 DNA 的特性有比较清楚的了解。目前,对鳞翅目(Lepidoptera)昆虫细胞系染色体的研究只处于在成系时研究其是否异倍化或多倍化的阶段,并没有对其染色体的制片方法和染色体数目进行详细的研究及介绍^[7-9]。由于在细胞系染色体分析中,秋水仙素及低渗溶液对细胞

收稿日期: 2007-12-12

基金项目: 国家林业局“948 项目(编号: 2002-52)和林业公益性行业科研专项(编号: 4-38)

作者简介: 张欣(1981—),女,云南彝良人,硕士。

* 通讯作者。

是否体现分裂相的影响较大^[10-11],所以在本研究中设计不同的秋水仙素和低渗溶液处理时间及浓度对 7 种鳞翅目昆虫细胞系进行了染色体分析,其中包括目前被广泛应用的工程细胞系 S θ 及 S θ 21,以获得各株细胞染色体分析的具体条件,从而总结出一套可行的鳞翅目昆虫细胞系染色体分析方法;并希望得到的分析结果能为这 7 种细胞系的进一步研究和应用提供遗传学及细胞生物学方面的背景资料及数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试细胞系 Ae (来源于桉大蚕蛾 *Antheraea eucalypti* Scott 卵巢), SES-MaBr-2 (来源于甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* Linnaeus 幼虫脂肪体), NIAS-MaBr-92 (甘蓝夜蛾 5 龄幼虫血球), S θ 21 (来源于草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Smith 卵巢细胞), S θ 9 (来源于草地夜蛾卵巢细胞克隆株), NIAS-Px- (来源于柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* Linnaeus 卵巢), FR FSp In-1229 (来源于桑斑血灯蛾 *Spilosana imparilis* Butler 5 龄幼虫脂肪体)。Ae、SES-MaBr-2、NIAS-MaBr-92、NIAS-Px-58、FR FSp In-1229 使用 MGM450 + 10% FBS (HyClone) 培养基; S θ 21、S θ 9 使用 TNM-FH + 10% FBS (HyClone) 培养基, 25℃ 下密闭无光照培养。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 溶液的浓度: 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, 分别继续培养 4 h、4.5 h 及 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%、0.58% 及 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 同浓度低渗 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 Ae

试验中分别采用 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理时间为 4、4.5、5 h 及 KCl 溶液浓度为 0.50%、0.58%、0.65% 处理 15 min 的 9 种正交预处理组合对 Ae 细胞进行染色体制片, 试验结果显示 (表 1): 只有当 KCl 处理浓度为 0.50% 时, 能看到细胞分裂相, 细胞内的染色体分散得较好, 能够数清其数目; 而当 KCl 处理浓度为 0.58% 和 0.65% 时, 细胞内的物质成团, 不能找到染色体。当 KCl 处理浓度为 0.50% 时, 秋水仙素处理的时间在 4.5 h 时能看到染色体的细胞较多, 处理 5 h 时其次, 而处理 4 h 时几乎不能看到有分裂相的细胞。综合比较各处理的结果, Ae 细胞的染色体制片以 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 4.5 h, KCl 处理浓度 0.50%, 处理时间为 15 min 时的效果最好。

Ae 细胞染色体的特征与前人研究鳞翅目昆虫细胞系一致^[9,12]。从形态上看, 染色体呈短杆状、颗粒状或点状, 染色体边缘不整齐, 染色体之间很难从形态上加以区分; 染色体的大小也没有很大的区别, 长度一般在 $2 \mu\text{m}$ 左右; 在染色体上没有缢痕, 分不清楚长臂、短臂, 应为弥散型的着丝粒 (图版 1)。在染色体数目上来看, 总体上细胞染色体的数量都较多, 细胞之间的染色体数目变化也较大, 异倍化严重。在统计的 100 个细胞中, Ae 细胞染色体数目分布呈明显的正态分布, 细胞的染色体数目最少的为 91 条, 最多的为 472 条, 平均每个细胞含有的染色体数目为 343 条, 其染色体主要分布在 340~370 之间 (图 1)。

表 1 不同预处理对 7种细胞的影响

0.005 mol · L ⁻¹ 秋水仙素 处理时间 /h	KCl处理浓度 (15min) /%	处理结果						
		Ae	SES-MaBr-2	NIAS-MaBr-92	Sl21	Sf9	NIAS-Px-58	FR T-Sp In-1229
4	0.50	+	-	+	++	+	-	+
4.5	0.50	+++	-	+++	+++	+	-	++
5	0.50	++	-	++	+++	+	-	+++
4	0.58	-	-	-	++	+	-	-
4.5	0.58	-	-	-	++	++	-	-
5	0.58	-	-	-	++	++	-	-
4	0.65	-	-	-	-	++	+++	-
4.5	0.65	-	++	-	-	+++	++	-
5	0.65	-	+++	-	-	+++	-	-

注：“+++”表示能找到大量分裂相细胞，“++”表示能找到少量分裂相细胞，“+”表示能找到个别分裂相细胞，“-”表示不能找到分裂相细胞。

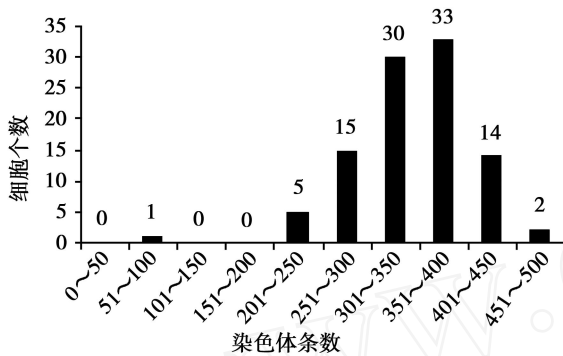


图 1 细胞系 Ae 染色体数目分布

2.2 SES-MaBr-2

试验中分别采用 0.005 mol · L⁻¹秋水仙素处理时间为 4、4.5、5 h 及 KCl 溶液浓度为 0.50%、0.58%、0.65% 处理 15 min 的 9 种正交预处理组合对 SES-MaBr-2 细胞进行染色体制片, 试验结果显示 (表 1): 只有当 KCl 处理浓度为 0.65% 时, 能看到细胞分裂相, 并能数清染色体数目, 在 KCl 浓度为 0.50% 和 0.58% 时, 细胞膜均破碎, 细胞质分散, 不能找到细胞的中期分裂相。当 KCl 处理浓度为 0.65% 时, 秋水仙素处理的时间在 5 h 时能看到染色体的细胞较多; 在秋水仙素处理时间为 4.5 h 时也能看见少量的染色体; 而在秋水仙素处理 4 h 时, 几乎就找不到染色体。综合比较各处理的结果, SES-MaBr-2 细胞染色体制片所适宜的条件是 0.005 mol · L⁻¹秋水仙素处理 5 h, 0.65% 的 KCl 低渗溶液处理 15 min。

SES-MaBr-2 细胞染色体也是表现出明显的鳞翅目昆虫细胞系染色体的特征。从染色体形态上看, 细胞内染色体数目较多, 各染色体的形态相似, 多为短杆状、圆点或椭圆点状。SES-MaBr-2 细胞染色体的个体大小的差异不大, 长度一般在 5 μm 左右, 比研究中所分析的其他鳞翅目昆虫的染色体要

大一些。在染色体上没有缢痕, 分不清楚长臂、短臂, 为弥散型的着丝粒 (图版 2)。在染色体数目上来看, 总体上细胞染色体的数量都较多, 统计的 100 个细胞染色体数目平均为 134 条, 其中含有染色体数目最多的为 243 条, 最少的为 104 条, 细胞的染色体数目主要分布在 110 ~ 140 条之间 (图 2), 由表中可看出几乎所有的细胞染色体数目都集中在 110 条到 150 条的范围内, 说明该株细胞在染色体异倍化的程度及进程上非常集中。

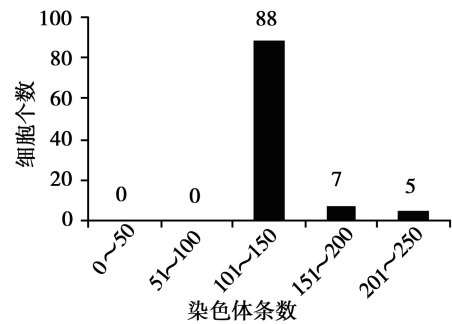


图 2 细胞系 SES-MaBr-2 染色体数目分布

2.3 NIAS-MaBr-92

试验中分别采用 0.005 mol · L⁻¹秋水仙素处理时间为 4、4.5、5 h 及 KCl 溶液浓度为 0.50%、0.58%、0.65% 处理 15 min 的 9 种正交预处理组合对 NIAS-MaBr-92 细胞进行染色体制片, 结果显示 (表 1): 只有当 KCl 处理浓度为 0.50% 时, 能看到细胞分裂相, 细胞内的染色体分散得较好, 能够数清其数目; 而在 0.58% 和 0.65% 的 KCl 处理浓度时, 细胞的颜色很深, 虽然能分清单个细胞, 但是细胞内的物质成团, 细胞核清晰但不能找到染色体。当 KCl 处理浓度为 0.50% 时, 3 种秋水仙素处理时间都能看见细胞, 处理的时间在 4.5 h 时能看到染色体的细胞较多, 处理 5 h 时的其次, 而处理 4 h 时的能看到有分裂相的细胞最少。综合比较各处理的结果,

N IASMaB r-92 细胞染色体制片最优的条件是 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 4.5 h, 0.50% 的 KCl 低渗处理 15 min。

N IASMaB r-92 细胞染色体也是呈典型的鳞翅目昆虫细胞系染色体的特征;从染色体特征上看,细胞内染色体数目较多;多为短杆状、圆点或椭圆点状;染色体之间很难从形态上加以区分;染色体的长度一般在 $2 \mu\text{m}$ 左右,没有缢痕,分不清楚长臂、短臂,为弥散型的着丝粒(图版 3)。从染色体数目上来看,总体上细胞染色体的数量较多,细胞之间的染色体数目变化较大,异倍化严重。在统计的 100 个细胞中,每个细胞的染色体数目最少的为 129 条,最多的为 560 条,平均每个细胞含有的染色体数目为 302 条,其染色体主要分布在 280~330 之间(图 3)。

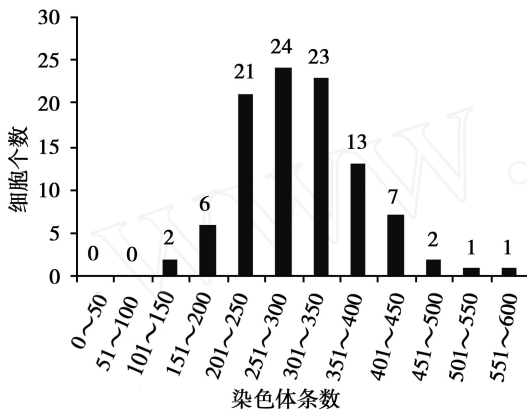


图 3 细胞系 N IASMaB r-92 染色体数数目分布

2.4 Sf21

试验中分别采用 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理时间为 4、4.5、5 h 及 KCl 溶液浓度为 0.50% 、 0.58% 、 0.65% 处理 15 min 的 9 种正交预处理组合对 Sf21 细胞进行染色体制片,结果显示(表 1):当 KCl 浓度为 0.50% 和 0.58% 时均能看见染色体,分散较好,能数清其数目,相对来说 0.50% KCl 的处理更好一些。而当 KCl 浓度为 0.65% 时,显示不出染色体来,在显微镜下能分清单个细胞,但看不到染色体,说明 Sf21 的染色体制片比较适合浓度低的 KCl 处理。而秋水仙素处理的时间对 Sf21 细胞染色体的制片影响是不大,当 KCl 浓度为 0.50% 和 0.58% 时,秋水仙素处理时间在 4 h 时看到的染色体少一些。综合比较各处理的结果, Sf21 细胞染色体制片最优的条件是 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 4.5~5 h, 0.50% 的 KCl 低渗处理 15 min。

Sf21 细胞的染色体呈典型的鳞翅目昆虫细胞系

染色体的特征,与其它鳞翅目昆虫细胞染色体不同的是, Sf21 细胞染色体在形态上除了上面所提及的短杆状、圆点或椭圆点状以外,还出现一些长杆状、短细线状形态;染色体的个体大小的差异也很大,长的有 $5.5 \mu\text{m}$ 左右,而短的只有 $2 \mu\text{m}$ 左右,在少部分长杆状的染色体可以观察到缢痕,可分清长臂、短臂,为亚中部着丝粒或端部着丝粒;而大部分染色体上没有缢痕,分不清楚长臂、短臂,为弥散型的着丝粒(图版 4)。从染色体数目上来看,在所统计的 100 个细胞中,每个细胞的染色体数目平均为 223 条,其中含有染色体数目最多的为 376 条,最少的为 144 条,细胞的染色体数目主要分布在 170~200 条之间(图 4)。

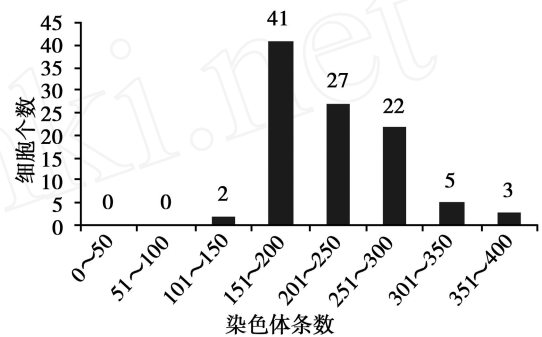


图 4 细胞系 Sf21 染色体数数目分布

2.5 Sf9

试验中分别采用 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理时间为 4、4.5、5 h 及 KCl 溶液浓度为 0.50% 、 0.58% 、 0.65% 处理 15 min 的 9 种正交预处理组合对 Sf9 细胞进行染色体制片,结果显示(表 1):在低渗浓度上,3 种低渗浓度都可看见染色体, 0.65% 的 KCl 的效果最好,染色体之间的重叠不多,较为分散、清晰。而在 0.58% 和 0.50% 时,虽然也能找到染色体,但细胞膜也较易破碎,不能判断看到的染色体是否属于同一细胞。在 KCl 浓度为 0.65% 时,3 种秋水仙素处理时间都可以看见染色体,处理 4 h 时少一些。综合比较各处理的结果, Sf9 细胞染色体制片最优的条件是 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 4.5~5 h, 0.65% 的 KCl 低渗溶液处理 15 min。

Sf9 细胞染色体也是表现出明显的鳞翅目昆虫细胞系染色体的特征,染色体特征与 Sf21 细胞极其相似,细胞内染色体数目较多,多为短杆状、圆点或椭圆点状,也有长杆状和短线状等,染色体长度在 $2 \sim 6 \mu\text{m}$ 之间;在少部分长杆状的染色体上可以观察到缢痕,为亚中部着丝粒或端部着丝粒;而大部分染色体上没有缢痕,分不清楚长臂、短臂,为弥散型

的着丝粒(图版 5)。从染色体数目上来看,在所统计的 100 个细胞中,每个细胞的染色体数目平均为 186 条,其中含有染色体数目最多的为 402 条,最少的为 142 条,细胞的染色体数目主要分布在 160 ~ 190 条之间(图 5),由图中可看出 S β 细胞染色体数目分布也是呈明显的正态分布,这说明大部分细胞染色体异倍化的程度大致相同。

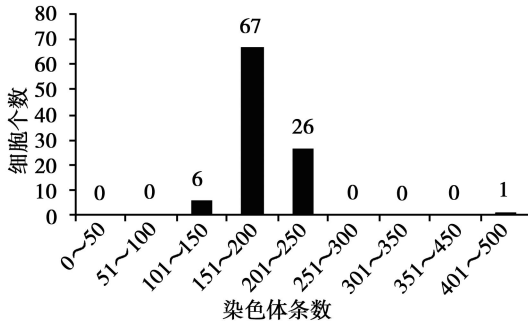


图 5 细胞系 S β 染色体数目分布

2.6 NIAS-Px-58

试验中分别采用 0.005 mol·L⁻¹秋水仙素处理时间为 4、4.5、5 h 及 KCl 溶液浓度为 0.50%、0.58%、0.65% 处理 15 min 的 9 种正交预处理组合对 NIAS-Px-58 细胞进行染色体制片,结果显示(表 1):只有当 KCl 处理浓度为 0.65% 时,能看到较好的细胞分裂相,并能数清其数目,在 KCl 浓度为 0.50% 和 0.58% 时,显示出来的状态相似:细胞膜破碎,细胞质分散,不能找到细胞的中期相。当 KCl 处理浓度为 0.65% 时,秋水仙素处理的时间在 4 h 时能看到染色体的细胞较多;在秋水仙素处理时间为 4.5 h 时也能看见少量的染色体;而在秋水仙素处理 5 h 时,几乎就找不到染色体。综合比较各处理的结果,NIAS-Px-58 细胞染色体制片所适宜的条件是 0.005 mol·L⁻¹秋水仙素处理 4 h,0.65% 的 KCl 低渗溶液处理 15 min。

NIAS-Px-58 细胞染色体也是表现出明显的鳞翅目昆虫细胞系染色体的特征。从染色体形态上看,染色体形态较小,长度一般在 1~2 μ m 左右;各染色体的形态相似,多为短杆状、圆点或椭圆点状,边缘不整齐,没有缢痕,为弥散型的着丝粒(图版 6)。染色体数目较多,各细胞间数目差异较大,异倍化严重,染色体数目主要分布在 100~200 之间,呈正态分布,其中数目最少的为 84 条,最多的为 412 条,平均为 184 条(图 6)。

2.7 FR I-Sp In-1229

试验中分别采用 0.005 mol·L⁻¹秋水仙素处理

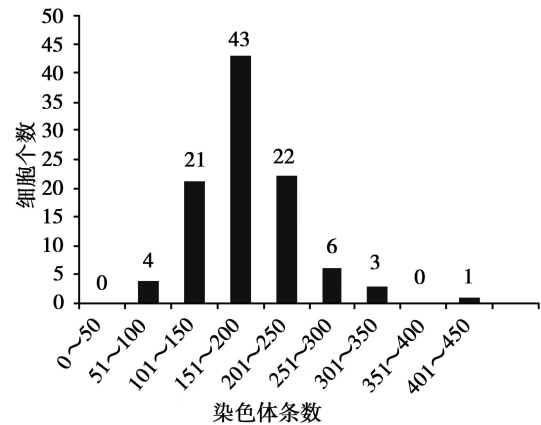


图 6 细胞系 NIAS-Px-58 染色体数目分布

时间为 4、4.5、5 h 及 KCl 溶液浓度为 0.50%、0.58%、0.65% 处理 15 min 的 9 种正交预处理组合对 FR I-Sp In-1229 细胞进行染色体制片,结果显示(表 1):只有当 KCl 处理浓度为 0.50% 时,能看到细胞中期分裂相,细胞内的染色体分散得较好,能够数清其数目;而当 KCl 处理浓度为 0.58% 和 0.65% 时,细胞内的物质成团不能找到染色体。当 KCl 处理浓度为 0.50% 时,秋水仙素处理的时间在 5 h 时能看到染色体的细胞较多,处理 4.5 h 时的其次,而处理 4 h 时几乎不能看到有分裂相的细胞。综合比较各处理的结果,Ae 细胞的染色体制片以 0.005 mol·L⁻¹秋水仙素处理 5 h, KCl 处理浓度 0.50%,处理时间为 15 min 时效果最好。

FR I-Sp In-1229 细胞染色体也是表现出明显的鳞翅目昆虫细胞系染色体的特征。从染色体形态上看,各染色体的形态相似,染色体呈短杆状、颗粒状或点状,边缘不整齐;除个别染色体能看到缢痕为亚中部着丝粒以外,其余大部分染色体没有缢痕应为弥散型的着丝粒;各染色体之间大小差异较大,长度在 1~5 μ m 左右均有分布。染色体数目较多,各细胞间数目差异较大,异倍化严重(图版 7)。染色体数目主要分布在 100~200 之间,呈正态分布,其中数目最少的为 43 条,最多的为 467 条,平均为 181 条(图 7)。

3 结论与讨论

试验结果表明:鳞翅目昆虫细胞系染色体制片要求严格,且各细胞系之间制片所需要的条件也不尽相同。7 种鳞翅目昆虫细胞的核型特征均表现相似:染色体形态多为弥散型着丝粒的短杆状、颗粒状、点状或圆球状;极少数为亚中部或中部着丝粒的

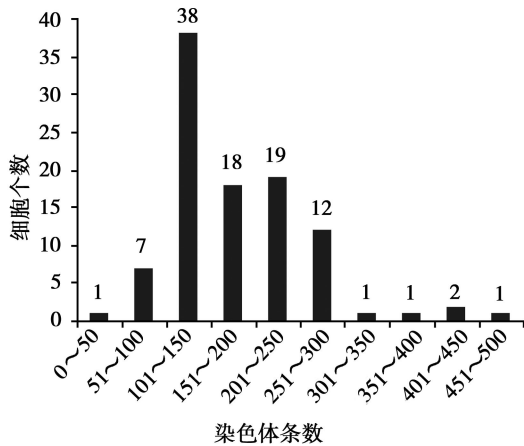
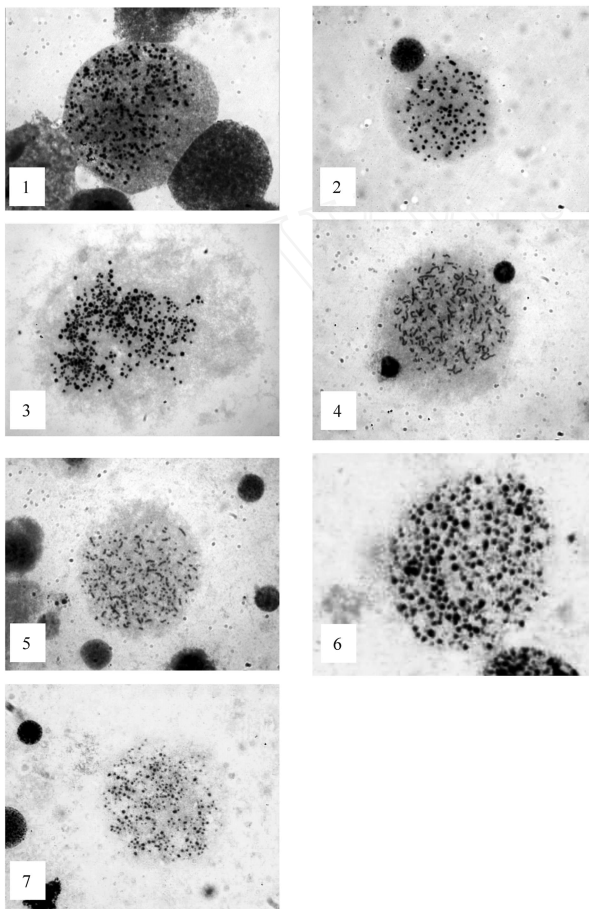


图 7 细胞系 FR I-SPM-1229 染色体数目统计



图版说明: 1: Ae 细胞染色体, 2: SES-MaBr-2 细胞染色体,
3: N AS-MaBr-92 细胞染色体, 4: S21 细胞染色体,
5: SB 细胞染色体, 6: N AS-Px-58 细胞染色体,
7: FR I-Sp In-1229 细胞染色体。

杆状。染色体数目众多, 异倍化及多倍化严重, 并且 7 种鳞翅目细胞染色体数目分布几乎都呈明显的正态分布, 这说明大部分细胞染色体异倍化的程度是大致相同的, 发生的变异程度都集中在一定的范围

之内。

染色体核型特征是昆虫细胞系生物学特征之一, 对昆虫细胞系进行染色体研究, 在其研究和应用上均具有重要意义。本研究通过 9 种不同的处理组合, 得出 7 种昆虫细胞系细胞染色体制作的具体条件及方法, 结果显示鳞翅目昆虫细胞对染色体制作的条件要求较高, 且各种细胞系的染色体分析条件也具差异性。这与双翅目昆虫细胞系的差异较大, 双翅目昆虫细胞系对染色体制作的条件要求较低, 各种细胞系的染色体分析条件也大致相同^[13], 这说明尽管都为昆虫细胞系, 但不同目之间的分析方法仍具有特性及差异性, 该试验结果为昆虫细胞系染色体分析提供了值得参考的试验数据。

目前, 只有少数鳞翅目昆虫的染色体数目被报道, 家蚕染色体数目为 $2n = 56$ ^[14], 甜菜夜蛾染色体数目为 $n = 31$ ^[15]。一般认为鳞翅目昆虫染色体数目多为 $n = 31$ ^[16], 而在本研究中, 7 种鳞翅目细胞系的染色体数目均不恒定, 数目较大且分布广泛, 不成完整的染色体组倍数, 显示出明显的异倍化特征。经过离体培养的细胞, 染色体数目的变异在很多动物中普遍存在^[17], 并且随着代数的增加而变异程度增大^[18], 所有动物细胞系在获得无限期培养的潜能时, 总是伴随着改变成为异倍体染色体组^[19]。目前, 导致昆虫细胞系染色体异倍化的原因还没有统一的认识, 张锡元^[20]认为: 离体培养细胞生长过程中细胞不稳定性增强, 是离体细胞突变率高于活体的重要因素。在长期离体培养的条件下, 可见光、温度、pH 值、培养基等的变化可能引起细胞的变异和提高细胞的突变率; 曾灵芳等^[21]认为染色体之间的差异可能是血清中的复杂成分长期作用引起的; 彩万志^[22]认为异倍化是在培养过程中, 细胞发生有丝分裂异常或是核内无丝分裂的结果; Peter^[23]则认为培养细胞的异倍化是由于一种脂质体从培养基中传递多种限制性内切酶及脱氧核苷酸酶到细胞中而引起的。

总之, 细胞系的异倍化与许多因素有关, 但具体和哪些因素相关及其影响机理是值得深入探讨的问题。从本试验可看出: 在不断的离体培养中, 鳞翅目昆虫细胞系的遗传物质发生了数量上和结构上的变异, 这些变异必将引起细胞生物特性的改变, 从而进一步影响它们的应用。细胞工程的应用普遍存在的问题是转化效率和表达的稳定性, 细胞的异倍化必然影响细胞的生物学特性, 而细胞的生物学特性改变

肯定也会对它的应用产生影响。对于培养细胞染色体异倍化影响因素的研究,可以规范工程细胞的培养,以便保持细胞的特性,稳定转化和表达效率;同时,在昆虫细胞系的建立上也将有很大的帮助。

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] 张佑红,朱雄伟,陈 燕. 昆虫细胞培养及其应用进展 [J]. 武汉化工学院学报, 2006, 28(3): 20 - 24
- [3] Smith G E. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector [J]. *Mol Cell Biol*, 1983, 13: 183 - 192
- [4] 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
- [5] 普孝英,洪锡钧,陈 敏,等. BmN 细胞有丝分裂及其染色体的研究 [J]. 蚕业科学, 2003, 29(2): 136 - 141
- [6] 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
- [7] Jaman-Smith R F, Armstrong S J, Al-Rubeai M. Chromosome Instability in *Spodoptera Frugiperda* Sf-9 Cell Line [J]. *Biotechnol Prog*, 2002, 18: 623 - 682
- [8] 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
- [9] 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
- [10] Jun Mitsushashi. *Invertebrate Tissue Culture Methods* [M]. Tokyo: Springer-Verlag, 2002: 323
- [11] 陈 航,陈晓鸣,冯 颖,等. 田紫胶虫红、黄两型染色体核型研究 [J]. 林业科学研究, 2006, 19(1): 32 - 38
- [12] Thomson J A, Grace T D C. Cytological observations on cell strains established in culture from insect Ovarian tissue [J]. *Aust J Biol Sci*, 1963, 16: 869 - 876
- [13] 张 欣,冯 颖,马 涛,等. 五种双翅目昆虫细胞系染色体分析 [J]. 林业科学研究, 2007, 20(4): 551 - 555
- [14] 李 维,葛方兰,叶德萍,等. 家蚕细胞遗传学及其应用 [J]. 遗传, 2006, 28(9): 1167 - 1172
- [15] 付建业,张青文,蔡青年,等. 甜菜夜蛾细胞分裂期染色体的观察 [J]. 昆虫学报, 2005, 48(1): 135 - 138
- [16] 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, 46(6): 773 - 782
- [17] 周亚竞,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
- [18] 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
- [19] Wharton J H, Ellender R D, Middlebrooka B L, *et al*. Fish cell culture: characteristics of a cell line from the silver perch, *Bairdiella chrysura* [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1997, 13(6): 389 - 397
- [20] 张锡元. 体细胞遗传学 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1986: 30
- [21] 曾灵芳,李文鑫,李 杰,等. 人肺癌转移胸水细胞系 HLAMP 的建立和生物学特征 [M] // 无血清细胞培养的研究. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1993: 160 - 167
- [22] 彩万志. 昆虫细胞分类学的基本问题及染色体系统发育的重建方法 [J]. 昆虫分类学报, 1994, 16(1): 4 - 14
- [23] Peter Raicu, Francise Mixich. Cytogetic effects of sodium azide encapsulated in liposomes on Heteroploid cell culture [J]. *Mutation Research Letter*, 1992, 283(3): 215 - 219