蝴蝶染色体核型分析

Karyotype Analysis of Butterflies

万雯婷^{1,2}, 董志巍¹, 李俊¹, 常洲¹, 王文^{1,2}, 李学燕^{1,*}

¹遗传资源与进化国家重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 昆明 6502232; ²西北工业大学, 西安 710129

*通讯作者邮箱: lixymail.kiz.ac.cn

引用格式: 万雯婷, 董志巍, 李俊, 常洲, 王文, 李学燕. (2021). 蝴蝶染色体核型分析. *Bio-101* e1010646. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010646.

How to cite: Wan, W.T., Dong, Z.W., Li, J., Chang, Z., Wang, W. and Li, X.Y. (2020). Karyotype analysis of butterflies. *Bio-101* e1010646. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010646. (in Chinese)

摘要: 自 20 世纪 30 年代, 我国学者就开始对昆虫染色体的核型进行了研究, 主要集中在果蝇、蝗虫、蚕类、蚜虫、摇蚊、蚂蚁等。染色体的核型分析为基因组学研究、细胞遗传学和分类学研究提供了重要的证据。本文以鳞翅目昆虫雄性蝴蝶末龄幼虫的精巢为研究材料, 通过秋水仙素预处理、低渗液处理、卡诺氏液固定, 然后制片并使用 Giemsa 液染色, 最后对获得的染色体进行观察和数目统计。本研究方法步骤简单, 是一种针对蝴蝶染色体核型分析的有效手段。

关键词: 染色体, 核型, 蝴蝶

研究背景

染色体是生物遗传物质的载体, 它们直接参与细胞分裂过程中遗传物质的交换与分配以及合子形成过程中两性配子的融合, 决定着生物的遗传机制 (Hearst and Botchan, 1970; Dobigny *et al.*, 2004; Gokhman and Kuznetsova, 2006)。在生物类群中, 染色体的数目、形态和结构具有相对恒定性, 并在其整个生命周期和各组织器官间均很稳定, 因此, 对不同类群染色体数目、组型等指标进行分析研究可鉴别各类群的染色体差异, 并能有助于阐明生物的遗传机制、类群间的系统发育以及物种的演化历程 (Pérez *et al.*,

1992; Bickmore, 2001; Gokhman and Kuznetsova, 2006)。本研究利用染色体核型技术 (Imai *et al.*, 1988; 黄国洋 等, 1994; Tanuja *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2007; Dalíková *et al.*, 2017; Lukhtanov and Dantchenko, 2017), 在蝴蝶中建立了一套实验流程, 能够获得有效的染色体分裂相。

材料与试剂

1. 移液器吸头
2. 离心管
3. 一次性注射器
4. 培养皿
5. 解剖刀
6. 镊子
7. 载玻片
8. 蒸馏水
9. 秋水仙素 (BBI, catalog number: A600322-0100)
10. 柠檬酸钠 (aladdin, catalog number: S189183-500g)
11. 甲醇 (Macklin, catalog number: M813895-500ml)
12. 冰醋酸 (Mreda, catalog number: M058454-500ml)
13. Giemsa 粉剂 (Sigma-Aldrich, catalog number: G4507-25G)
14. 甘油 (aladdin, catalog number: G116203-500ml)
15. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, catalog number: 1065790500)
16. KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, catalog number: P9791)
17. Giemsa 染色液: 将 Giemsa 原液、0.067 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶液和 0.067 mol/L KH_2PO_4 溶液按照比例为 2:9:9 混合, 即为 Giemsa 染色液。配制染色液所需的三种原液可按如下方法配制。
 - 1) **Giemsa 原液:** 量取 3 ml 甲醇, 30 ml 甘油, 并称取 Giemsa 粉剂 0.5 g, 备用。操作过程: ①将约 10 ml 的甘油置于研钵中, 再加入 Giemsa 粉剂, 研磨到无颗粒; ②再将剩余约 20 ml 甘油倒入研钵中, 于 56 °C 水浴中加热约 20–30 min, 期间需摇动, 使其溶化成匀浆状; ③冷却后加入 3 ml 甲醇, 室温下放

置数周后使用。

- 2) **0.067 mol/L Na₂HPO₄·12H₂O 溶液**: 将 23.8 g Na₂HPO₄·12H₂O 用蒸馏水溶解, 置于 1,000 ml 容量瓶中定容。
- 3) **0.067 mol/L KH₂PO₄ 溶液**: 将 9.078 g KH₂PO₄ 用蒸馏水溶解, 置于 1,000 ml 容量瓶中定容。

仪器设备

1. 体视显微镜 (Nikon SMZ745, Japan)
2. 荧光显微镜 (Nikon ECLIPSE E400 显微镜 + Nikon 数码相机 Dxm1200)

实验步骤

1. **秋水仙素预处理**: 取末龄雄性幼虫注射 100 μ l 的 0.32 mg/ml 秋水仙素 (此步骤可以有效的提高细胞分裂相指数), 处理时间为 4-6 h。
2. **解剖取材**: 将秋水仙素处理的末龄雄性幼虫活体解剖取出精巢, 剔除周围的结缔组织、脂肪及其他杂物。
3. **低渗处理**: 将处理干净的精巢置于 0.075 mol/L 的柠檬酸钠中低渗处理 10 min, 弃去柠檬酸钠 (此步骤可以使细胞吸水, 导致细胞膨胀破裂, 有利于染色体的分散; 低渗时间过长会导致细胞数减少或染色体丢失, 时间过短会导致染色体分散效果差, 易重叠, 不利于染色体的观察和分析)。
4. **固定处理**: 将低渗后的精巢置于新鲜配制的卡诺氏液 (甲醇:冰醋酸=3:1) 中固定两次, 每次半个小时, 弃去卡诺氏液 (此步骤会影响染色体标本的制作, 必须使用新鲜配制的卡诺氏液; 固定时间要充足, 时间不足会导致染色体模糊不清)。
5. **软化处理**: 加入 200 μ l 新鲜配置的 45%冰醋酸, 用移液器轻轻吹打, 使细胞均匀散开。
6. **制片**: 取 60 °C 预热过的载玻片, 立即将软化后的细胞悬浮液滴一滴在玻片上, 细胞在玻片上散开, 室温下空气干燥。
7. **染色**: 以稀释 10 倍的 Giemsa 染色液对干燥后的玻片进行染色 1-2 h, 用过滤水冲洗后晾干。
8. **镜检分析**: 先在低倍 (20 倍) 的显微视野下寻找细胞较多的区域, 然后再转到中高

倍数 (40 倍) 的显微视野下寻找完整的染色体分裂相; 因蝴蝶的染色体较小, 需寻找分散较好的、没有粘连和叠加的染色体分裂相, 经高倍数 (100 倍) 显微照相后, 进行染色体计数, 例图 1。

图 1. 枯叶蛱蝶末龄雄性幼虫精巢染色体 (n=31) (Yang *et al.*, 2020)

注: 对不同的物种, 秋水仙素的浓度和处理时间、低渗时间均不同, 需要对类群和种类进行预实验摸索进而确定。

致谢

感谢国家自然科学基金委员会创新研究群体 (31621062)、国家自然科学基金委员会面上项目 (32070482)、中国科学院西部之光项目 (A 类) 对中国科学院昆明动物研究所遗传资源与进化国家重点实验室的支持。

参考文献

1. 黄国洋, 王荫长, 尤子平. (1994). [鳞翅目昆虫染色体的研究方法](#). 华东昆虫学报 3 (1): 71–74.
2. Bickmore, W. A. (2001). [Karyotype analysis and chromosome banding](#). edited by D. N. Cooper. Chichester: John Wiley & Sons: 7.
3. Dalíková, M., Zrzavá, M., Hladová, I., Nguyen, P., Šonský, I., Flegrová, M., Kubíčková, S., Voleníková, A., Kawahara, A. Y., Peters, R. S. and Marec, F. (2017). [New insights into the evolution of the W chromosome in Lepidoptera](#). J

Hered 108: 709–719.

4. Dias, C. M., Schneider, M. C., Rosa, S. P., Costa, C. and Cella, D. M. (2007). [The first cytogenetic report of fireflies \(Coleoptera, Lampyridae\) from Brazilian fauna.](#) *Acta Zoologica* 88: 309–316.
5. Dobigny, G., Ducroz, J. F., Robinson, T. J. and Volobouev, V. (2004). [Cytogenetics and cladistics.](#) *Syst Biol* 53 (3): 470–484.
6. Gokhman, V. E. and Kuznets ova, V. G. (2006). [Comparative insect karyology: current state and applications.](#) *Entomological Review* 86 (3): 352–368.
7. Hearst, J. E. and Botchan, M. (1970). The eukaryotic chromosome. *Annual Review of Biochemistry* 39: 151–182.
8. Imai, H. T., Taylor, R. W., Crosland, M. W. and Crozier, R. H. (1988). [Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis.](#) *Jpn J Genet* 63: 159–185.
9. Lukhtanov, V. A. and Dantchenko, A. V. (2017). [A new butterfly species from south Russia revealed through chromosomal and molecular analysis of the *Polyommatus \(Agrodiaetus\) damonides* complex \(Lepidoptera, Lycaenidae\).](#) *Comp Cytogenet* 11 (4): 769–795.
10. Pérez, R., Panzera, Y., Scafiezzo, S., Mazzella, M. C., Panzera, F., Dujardin, J. P. and Scvortzoff, E. (1992). [Cytogenetics as a tool for triatomine speciesdistinction \(Hemiptera-Reduviidae\).](#) *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87 (3): 353–361.
11. Tanuja, M. T., Ramachandra, N. B. and Ranganath, H. A. (2003). [Hybridization and introgression of the genomes of *Drosophila nasuta* and *Drosophila albomicans*: evolution of new karyotypes.](#) *Genome* 46 (4): 605–611.
12. Yang, J., Wan, W., Xie, M., Mao, J., Dong, Z., Lu, S., He, J., Xie, F., Liu, G., Dai, X., Chang, Z., Zhao, R., Zhang, R., Wang, S., Zhang, Y., Zhang, W., Wang, W. and Li, X. (2020). [Chromosome-level reference genome assembly and gene editing of the dead-leaf butterfly *Kallima inachus*.](#) *Mol Ecol Resour* 20 (4): 1080–1092.