

兽类骨骼标本制作新方法: 碱性蛋白酶消化法

武永华 杨奇森*
(中国科学院动物研究所, 北京 100101)

关键词: 兽类; 骨骼标本制作; 碱性蛋白酶消化

中图分类号: Q95-342

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2009) 02-0227-04

Mammalian skeleton specimen preparation using proteolytic enzyme (alkalase) detergent

WU Yonghua, YANG Qisen*

(Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract We report on an easy method to remove muscle tissue from the skeleton by alkalase detergent in mammalian skeleton specimen preparation. In the present paper, using hare skull specimen as an example, we describe the alkalase detergent method in details and compare it with other methods for mammalian skeleton specimen preparation. In this method, hare muscle tissues are removed from skeletons by alkalase detergent. With commercial proteases alkalase (2.4 L, 2.4 AU/g, Novozymes Biotechnology Co., Ltd.), the process requires around 10 minutes' skeletal simmering in a 0.5% solution (V/V) of the alkalase and water under 60 °C condition. In total, about 101 rat skull and 487 hare skull specimens are made using this method. Compared to other traditional methods in mammalian skeleton specimen preparation, the alkalase detergent method is safer, more efficient and less costly, and it is also suitable for batch production of skeleton specimen.

Key words Alkalase detergent; Mammal; Skeleton specimen preparation

兽类骨骼标本不但具有展示的功能, 而且在传统的形态分类中也具有重要的作用。随着种群遗传学的发展, 我们往往希望能从形态和遗传两方面分析种群间的分化。这就需要有大量的骨骼标本, 因此, 骨骼标本的批量制作就显得非常必要。

通常, 骨骼标本制作的主要环节包括: 剔除软组织, 脱脂和漂白。其中, 最为费时费力的环节就是剔除骨骼上的软组织。在形态学的研究中, 煮制法被广泛用于兽类骨骼标本的制作 (徐文贤, 1993; 朱孝荣和袁红花, 1998; 肖方, 1999; 刘华金等, 2004)。这是因为采用该方法所需的条件很简单, 对几个标本来说是经济适用的; 然而, 该方法费时费力并且也无法将微细结构的骨骼清理干净。当制作的标本较多时, 煮制法就难以满足需要, 相应地一些新方法就被用来制作骨骼标本, 一个可替代的方法是虫蚀法, 皮蠹 (Hall and Russell, 1933; Borell, 1938)、面包虫 (宋树春和王峰, 2001; 邱挺, 2004; 张成菊和吴毅, 2005) 和蚂蚁 (陈志等, 2006) 等都不失为一些可用的选

择。虽然采用虫蚀法可以节省人力和时间, 但会在骨骼表面较均匀地残留一层软组织碎屑, 并且皮蠹和蚂蚁的大量获得不太容易。此外, 微生物腐蚀法 (土埋法, 水浸法) 也可以用来制作骨骼标本 (肖方, 1999), 但由于该方法会污染环境并且所需时间久, 现在已很少使用。

其次, 四水过硼酸钠 ($\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 也曾用于骨骼标本的制作 (Chapman and Chapman, 1969), 此方法后经改进 (McDonald and Vaughan, 1999), 其效果类似于上面讲的虫蚀法。除此, 商业洗涤剂也被用来制作骨骼标本。商业生产的洗涤剂往往含有一些降解蛋白的酶, 从而被用来制作骨骼标本 (Ossian, 1970; Mooney *et al.*, 1982; 胡琪和欧阳铭, 2001)。采用洗涤剂产品制作骨骼标本的缺点, 一方面是骨骼软组织残留较多, 另一方面是用时较长。

了解当代分子生物学知识的人可能都知道, 提取 DNA 过程的第一步就是用蛋白酶 K 消化去除蛋白组织。这为本文尝试采用蛋白酶降解附着在骨骼

作者简介: 武永华 (1978-), 男, 博士研究生, 主要从事保护遗传学研究。E-mail: wyh781230@ioz.ac.cn

收稿日期: 2008-07-31; 修回日期: 2008-12-17

* 通讯作者, corresponding author. E-mail: yangq@ioz.ac.cn

上的软组织带来了启发。在比较了当前市场上多种蛋白酶的成本以及降解蛋白能力等后,我们最终选用碱性蛋白酶用以头骨标本的制作。在我们所能查阅的文献中,碱性蛋白酶还没有被明确提到用于制作骨骼标本,故此报道。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂、工具

材料:仓鼠头 1个,三趾跳鼠头 100个,塔里木兔头 487个,每个标本上均系有竹标签,并用铅笔标记野外号。

试剂及工具:碱性蛋白酶 (Alcalase 2.4 L, 酶活力 2.4 AU/g 诺维信生物技术有限公司), 自来水, 竹标签, 牙刷, 手术刀, 搪瓷盘, 直头镊子, 弯头镊子, 恒温水浴箱。

1.2 实验步骤

(1) 在恒温水浴箱中加入纯净水,并调节水温至约 60 °C (碱性蛋白酶水解的最适温度)。

(2) 实验材料预处理: 首先将头骨从动物尸

体上剥离,剔除附着在骨骼上的大块肌肉,主要包括下颌骨两侧的肌肉,以及眼睛和舌,最后把颅腔中的脑髓用直头镊子由枕骨大孔伸入搅几下便于消化液进入。

(3) 配制消化液: 将碱性蛋白酶与自来水按体积比 1:200 混合成消化液。

(4) 将预处理过的标本放入搪瓷盘内,倒入消化液直至稍稍没过标本。随后将搪瓷盘放入恒温水浴箱内,注意不要使水浴箱内的水进入搪瓷盘,最后盖上水浴箱盖。

(5) 约过 7~8 min 后用直头镊子夹出其中一个标本,初次查看消化的效果。软组织若有残留则继续消化约到 10 min 再次查看,如果附着的软组织基本都已干净就可以捞出标本 (消化液可反复使用 5 次以上)。

(6) 在自来水笼头下用牙刷刷洗骨骼,并用弯头镊子掏净脑颅中的脑髓。

(7) 脱脂,漂白,晾干头骨。

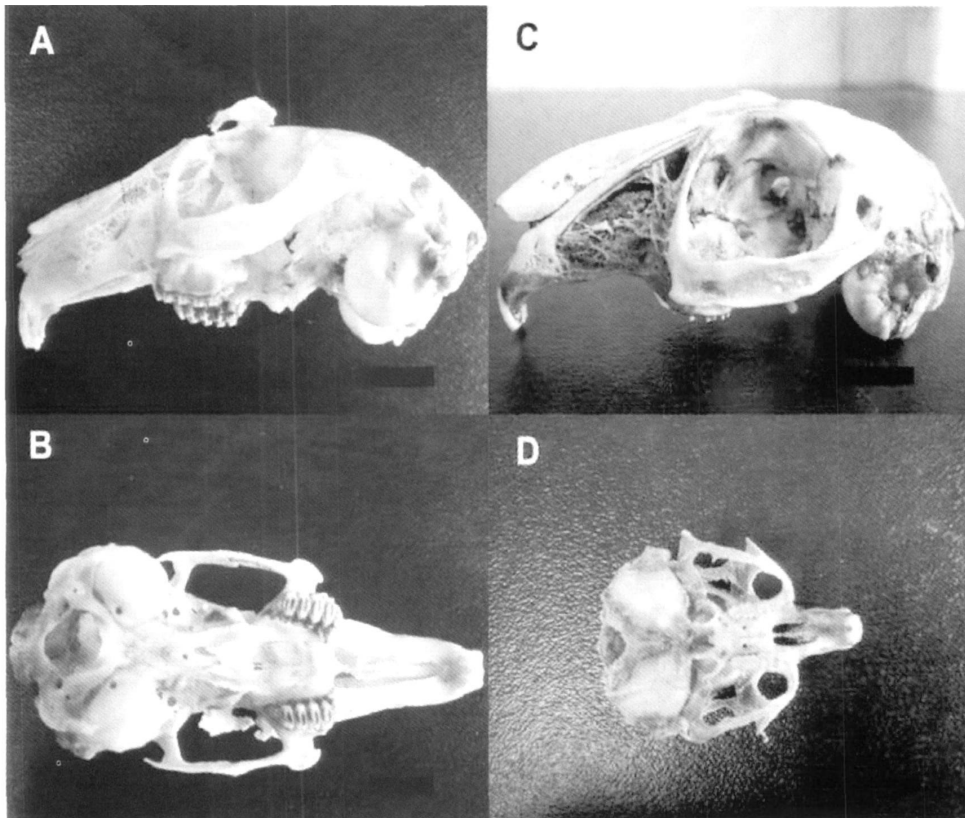


图 1 不同方法制作的兽类头盖骨标本。(A) 碱性蛋白酶消化法制作的塔里木兔头盖骨侧面;(B) 碱性蛋白酶消化法制作的塔里木兔头盖骨腹面;(C) 手工完成的馆藏草兔头盖骨侧面;(D) 面包虫蚀的三趾跳鼠头盖骨腹面

Fig. 1 The mammalian cranium specimens made by different methods (A) lateral view of cranium of *Lepus yarkandensis* made by the alkalase detergent (B) ventral view of cranium of *Lepus yarkandensis* made by the alkalase detergent (C) lateral view of cranium of *Lepus capensis* made by the artificial method (D) ventral view of cranium of *Dipus sagitta* made by the demestilm method

2 结果

我们用该方法共试做了 588 个兽类头骨标本, 其中包括 1 只仓鼠, 100 只野生三趾跳鼠和 487 个野兔, 每次实验效果都很稳定。与其它方法比较, 碱性蛋白酶消化法的优点在于以下几方面:

第一, 制作的骨骼标本干净。消化后软组织残留很少, 除了一些筋难于消化外, 其余软组织基本都可以去除。并且鼻腔和听泡内手工难以触及的死角也可以消化干净。为了对照分析, 图 1 中也包括了馆藏手工制作的草兔头骨标本和本研究组之前用面包虫制作的三趾跳鼠头骨标本。图 1 中草兔和跳鼠标本尚未经过脱脂和漂白工序, 但这不影响我们的对照效果, 因为脱脂和漂白不影响残留软组织的存留。显而易见的是, 经碱性蛋白酶消化所得标本非常干净, 很少有软组织残留。

第二, 成本低廉。碱性蛋白酶 2.4 kg 包装的体积约为 1 200 ml, 市售价为 340 元, 如果将其与水配置成体积比为 1/200 的消化液, 再假定消化液可反复使用至少 5 次, 则每个兔头骨所分担的碱性蛋白酶成本约为 0.03 元。另外, 消化所需设备简单, 可以灵活选择。在实际工作中, 只要能提供酶消化所需温度的装置便可, 并不限于本次实验所用的恒温水浴箱。市场上用于鱼缸的恒温加热棒放入适当的容器也可以用来提供消化的环境。

第三, 耗时少, 效率高。去除大块软组织后的头骨消化起来非常省时, 对于本实验的野兔头骨, 平均消化时间为 10~15 min, 只要能够提供足够大的容器, 每人每天几乎可以完成上百个头骨标本的制作, 而传统的人工方法需要将样本水煮后人工一点一点去除, 一个熟练技术工一天最多只能做 5~6 个标本。

第四, 安全性高。比起其它方法, 碱性蛋白酶对人体的伤害非常小, 并且也不会污染环境, 废液容易处理, 可直接排入地下管道。酶是蛋白质, 对于敏感的人来说吸入酶粉尘或雾滴有可能发生过敏, 过长时间接触有可能刺激皮肤、眼睛和粘膜组织。在实际操作中, 只要带上橡胶手套并在通风的情况下就可以避免它对人体所带来的伤害。

3 讨论

首先, 消化液的工作浓度。本次实验所用的碱性蛋白酶原溶液活力单位为每克溶液 2.4 AU, 该酶的密度约为每毫升溶液 1.2 g, 如果以 1:200 的

比例配成消化液, 碱性蛋白酶的工作浓度就为每毫升消化液 0.014 AU。在实际操作中, 我们反复实验过不同的浓度, 浓度太高会浪费试剂并且会损坏骨骼, 使得骨缝连接处容易分开。浓度过低又会费时。1:200 的比例虽然不是最优的工作液配比, 却是我们多次实验获得的相对好的配比。不同动物可能需要不同的工作液配比, 这需要多次的预实验来确定。

其次, 消化的温度。碱性蛋白酶是由选育出的地衣芽孢杆菌生产得到的, 该酶的主要有效成分为枯草杆菌蛋白酶 A, 是一种内切蛋白酶, 其最适工作条件为温度 55 °C ~ 70 °C 之间 (取决于底物的类型), 最适温度约 60 °C, pH 6.5~8.5。在实际操作中温度控制在 55 °C ~ 60 °C 都可以。

最后, 消化的时间。本次实验所需的消化时间约 10 min 左右。当然, 消化的时间主要受消化液的浓度、消化的温度、以及消化底物量等的影响。在前两者一定的情况下, 消化底物的量应尽可能减少, 即尽可能剔除多余的软组织。因为软组织在骨骼上的不均匀分布, 会导致各个部位消化不同步, 从而可能使得先消化完的部位骨骼容易脱落, 比如鼻骨, 而有些部位却还没消化完。所以, 在消化前去除那些大块的软组织会明显提高消化的效率。至于如何去除大块的软组织, 我们可以先用水煮几分钟, 然后直接用手术刀或镊子去除。有时还可以采用面包虫嗑的方法。可见将传统方法和酶消化法结合运用更有效。另外注意的是, 在同一批次的样本中, 应尽量安排同一年龄组的个体, 因为幼体往往先于成体消化完全, 并且骨骼容易从骨缝处分离, 尤其是枕骨易分离。

本次实验, 我们用碱性蛋白酶消化法制作野兔和鼠类的头骨标本, 取得了很好的效果。这种酶消化的方法不但可以用于兽类头骨, 还可以用于兽类全身骨骼标本的制作。同样, 从原理上讲, 这种方法可能也适用于两栖爬行以及鸟类骨骼标本的制作。另外, 对制作不同动物骨骼标本所需消化液的浓度, 可以在本文 1/200 体积比的基础上进行预实验, 大型兽类的骨骼需要的酶浓度可能稍高, 而两栖爬行或鸟类的骨骼可能要稍低。需要注意的是, 这种方法可能会对骨质造成一定的损伤, 这是因为骨骼的组成成分也含有一定量的蛋白, 但这种损伤需要经过长期的观察才能了解, 在短期内我们还没有发现相应的损伤。只要我们在消化之前尽量去除多余的软组织, 采用合适的消化液浓度, 减少消化

的时间,就能最小程度地减小酶消化对骨骼的损伤。

致谢:在讨论中刘杰对我们提出酶消化法给予了启示,北京华章未央科技有限公司的王霞,就酶的选择给予了相应的帮助,用于实验的仓鼠样本由熊文华提供,冯祚建先生对本文写作给予了指导,在此一并表示感谢。

参考文献:

- Borella E. 1938. Cleaning small collections of skulls and skeletons with demestid beetles. *Journal of Mammalogy*, **19** (1): 102-103.
- Chapman D, Chapman N G. 1969. The use of sodium perborate tetrahydrate ($\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) in the preparation of mammalian skeletons. *Journal of Zoology* (London), **159**: 522-523.
- Hall E R, Russell W C. 1933 Demestid beetles as an aid in cleaning bones. *Journal of Mammalogy*, **14**: 372-374.
- Hu Q, Ou Y M. 2001. An example of making skull exemplar. *Journal of Wuhan University of Science and Technology* (Natural Science Edition), **24** (2): 208-209. (in Chinese)
- McDonnell R A, Vaughan N. 1999. An efficient way to prepare mammalian skulls and bones. *Mammal Review*, **29**: 265-266.
- Moon ey M P, Kraus E M, Bardach J, Snodgrass J I. 1982. Skull preparation using the enzyme active detergent technique. *The Anatomical Record*, **202**: 125-129.
- Ossian C R. 1970. Preparation of disarticulated skeletons using enzyme based laundry "pre-soakers". *Copeia*, **1**: 199-200.
- Zhang C J, Wu Y. 2005. Method of using larva of *Tenebrio molitor* to manufacture skull specimen of small mammals. *Sichuan Journal of Zoology*, **24** (4): 586-588. (in Chinese)
- 刘华金, 李亮, 蒋俊, 陈安. 2004. 用稀硫酸溶液制作人体骨标本的方法. *四川解剖学杂志*, **12** (3): 234.
- 朱孝荣, 袁红花. 1998. 兔骨骼标本制作. *上海实验动物科学*, **18** (1): 47-48.
- 宋树春, 王峰. 2001. 一种简便制作动物骨骼标本的方法. *生物学通报*, **36** (4): 35.
- 张成菊, 吴毅. 2005. 利用面包虫制作小兽头骨标本方法的探讨. *四川动物*, **24** (4): 586-588.
- 肖方. 1999. 野生动植物标本制作. 北京: 科学出版社, 150-157.
- 邱挺. 2004. 虫蚀法制作小型动物骨骼标本. *教学仪器与实验*, **1**: 35.
- 陈志, 曾照芳, 杜晓兰, 陈林. 2006. 制作小鼠骨骼标本的新方法. *第三军医大学学报*, **28** (23): 2390.
- 胡琪, 欧阳铭. 2001. 颅骨标本制作一例. *武汉科技大学学报* (自然科学版), **24** (2): 208-209.
- 徐文贤. 1993. 骆驼骨骼标本制作方法简介. *中国兽医科技*, **23** (1): 45-46.