

适合花鲈的几种染色体制备方法的比较

沙珍霞^{1,2}, 陈松林¹, 叶寒青^{1,2}, 徐美瑜¹, 刘洋^{1,2}, 季相山^{1,3}, 唐启升¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003; 3. 上海水产大学, 上海 200090)

摘要:比较了6种适于制备花鲈(*Lateolabrax japonicus*)染色体的制片方法。结果表明,细胞系(LJES)培养法和头肾-PHA活体注射-淋巴分离液富集法可制备高质量的染色体标本;外周血短期培养法和头肾-PHA活体注射法得到的结果重复性好,但制片时有红细胞的干扰;小鱼游泳法和组织浸泡法操作简单,适于野外条件下的染色体制备,但得到的染色体图像有背景杂质,分裂指数较低,仅适用于染色体组型的研究。

关键词:花鲈;染色体制备方法

中图分类号:Q959.483

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2003)06-0469-05

染色体制备作为细胞遗传学研究的一项基本技术,对于研究鱼类的遗传变异、分类和系统进化、性别决定、杂交育种及环境污染检测等具有重要意义^[1]。Ojima^[2]采用空气干燥法发表了第1篇鱼类染色体组型研究的报道。此后,鱼类染色体的研究得到较快发展。在取材上主要为短期培养细胞如外周血培养细胞或肾-PHA短期培养细胞^[3-6]、细胞系细胞^[7-9]、活体组织^[10-12]和胚胎^[13]等细胞分裂增殖能力强的器官组织。我国海水鱼类染色体研究相对落后,共报道过46种海水鱼类的染色体,多数停留在常规的核型分析上^[1],染色体制备基本上沿用淡水鱼类的研究方法。本研究以海洋经济鱼类花鲈为材料,比较了外周血培养法、细胞培养法、头肾-PHA注射法、头肾-PHA注射-淋巴分离液富集法、小鱼游泳法、组织浸泡法等,试图找到方便快捷、分裂指数高、质量好、利于染色体基因定位和染色体原位杂交等后续研究的鱼类染色体制备方法。

1 材料和方法

收稿日期:2003-02-28; 修订日期:2003-07-25.

基金项目:国家自然科学基金(30170740);国家“八六三”高新技术研究发展项目(2202AA629180).

作者简介:沙珍霞(1970-),女,助理研究员,硕士,主要从事鱼类生物技术研究. E-mail: shazx@ysfri.ac.cn

通讯作者:陈松林. Tel: 0532-5844606;

E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

1.1 材料

花鲈胚胎干细胞系(LJES1)由本实验室建立^[9]。

花鲈成鱼体重100~200 g,购自胶州养殖场和青岛南山市场,花鲈幼鱼为本所麦岛增殖基地培养,体长2 cm左右。每种方法取鱼6尾,进行2次重复实验。

秋水仙素:Servo产品,国内分装;PHA:上海伊华医药科技有限公司产品;淋巴细胞分离液:上海恒信化学试剂有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 外周血培养法 参考吴政安^[14]方法。花鲈体表消毒后,自尾静脉采全血0.1 mL,放入4 mL培养液中26℃培养48 h。培养液的组成为:eagle MEM基础培养液,100 U/mL青霉素和链霉素、PHA 50 μL/mL,pH调整至7.4。加终浓度为5 μg/mL的秋水仙素处理4 h,1 500 r/min离心5 min收集细胞,75 mmol/L KCl溶液低渗30 min,新鲜配制的卡诺氏液(甲醇与冰醋酸体积比为3:1)固定4次,每次20 min,冷片法滴片,空气干燥过夜。5% Giemsa染液染色25 min,显微镜观察计数。低渗和染色均在25℃条件下进行。

1.2.2 细胞培养法 6~50代的花鲈胚胎干细胞(LJES1)于20℃培养至对数生长期,秋水仙素终浓度为10 μg/mL处理4 h,其余步骤同方法1.2.1。

1.2.3 头肾-PHA 注射法 参照林义浩^[10]方法。每条鱼体腔注射 10 $\mu\text{g/g}$ PHA, 25 $^{\circ}\text{C}$ 海水中培养 20 h 后, 按 2 $\mu\text{g/g}$ 体腔注射秋水仙素, 3.5 h 后, 断尾放血取头肾在 0.7 % 生理盐水中剪碎, 弃去组织碎块, 离心细胞悬液收集细胞 (1 500 r/min, 5 min), 生理盐水洗涤 2 次, 其余步骤同方法 1.2.1。

1.2.4 头肾-PHA 注射-淋巴细胞富集法 在海燕等^[15]方法上加以改进。PHA 和秋水仙素注射剂量、作用时间及头肾细胞收集同方法 1.2.3; 将细胞悬浮液缓缓加到装有等体积淋巴细胞分离液的离心管中, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集中间层富集的淋巴细胞, 其余步骤同方法 1.2.1。

1.2.5 小鱼游泳法 按照张四明^[12]方法操作。将幼鱼放在 0.01 % 秋水仙素的海水溶液中充气培养 6 h。断尾放血取鳃丝, 放入 75 mmol/L KCl 溶液低渗 35 min 后, 将鳃丝放入甲醇与冰醋酸体积比 9:1 的固定液中处理 10 min, 在转入 100 % 的冰醋酸中处理 1~2 min, 放入新鲜配制的卡诺氏液中固定 3 次, 每次 1 h, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜。制片前, 将固定过的组织放入 50% 的冰醋酸中解离 10 min, 用镊子轻轻抖动鳃丝, 制成细胞悬液, 热片法滴片, 染色、镜检同方法 1.2.1。

1.2.6 组织浸泡法 取小鱼胸鳍、腹鳍、背鳍和尾

鳍末端鳍条或成鱼鳍产生的愈伤组织及小鱼鳃丝, 放入 0.04 % 的秋水仙素半海水溶液中浸泡 40 min, 转入 25 % 的海水中预低渗 30 min, 低渗、固定步骤同 1.2.1, 解离、滴片步骤同方法 1.2.5, 染色、镜检同方法 1.2.1。

2 结果

2.1 染色体形态及染色体频率分布

用上述方法制备的花鲈染色体, 均能得到效果较好的中期分裂相。染色体全部为端部染色体, 其核型为 $2n=48t$, 与 Kitada 和王金星^[16]报道的相似。实验结果如图 1 所示。

每种方法观察 100 个图象清晰、染色体分散良好的中期分裂相, 确定了染色体的众数为 $2n=48$ 。每种方法的分裂相中 48 条染色体所占比例依次是: 外周血短期培养法为 62%, 细胞培养法为 61%, 头肾-PHA 活体注射法为 66%, 头肾-PHA 活体注射-淋巴细胞分离液富集法占 69%, 小鱼游泳法和组织浸泡法分别为 60% 和 58%。染色体频率分布见图 2。

2.2 染色体分裂指数

在 100x 显微镜下, 每种实验方法随机统计 30 个视野, 计算细胞的有丝分裂指数。结果如表 1 所示。

表 1 不同方法制备的花鲈染色体有丝分裂指数比较
Table 1 Mitotic division index with the different chromosome preparations of sea perch

实验方法 Method	细胞总数 Total cell number	分裂相总数 Number of metaphase	有丝分裂指数/% Mitotic division index	细胞数/视野 Cells/scope ($\bar{X} \pm \text{SD}$)
外周血短期培养法 Blood cell culture	7824	88	1.5	263 $\pm$ 106
胚胎干细胞培养法 ES cell culture method	2298	145	6.3	76 $\pm$ 20
头肾-PHA 注射-淋巴细胞富集法 Head kidney PHA injection in vivo and lymphocytes enriched method	3157	262	8.2	105 $\pm$ 10
头肾-PHA 注射法 Head kidney PHA injection in vivo method	9041	99.5	1.1	301 $\pm$ 15
小鱼游泳法 Juveniles swimming method	5864	27.7	0.5	198 $\pm$ 7
组织浸泡法 Tissue soaked method	5539	16.9	0.3	184 $\pm$ 7

3 讨论

与哺乳动物相比, 鱼类细胞的染色体数目多, 形状小, 分裂指数低^[14], 制备大量分裂相且染色体图象清晰的片子较难^[17]。而精确的染色体组型研究和显带分析尤其是染色体荧光原位杂交、染色体涂染等又要求高分裂指数、染色体形态清晰、数目完整、无杂质干扰的制备方法。本研究所运用的 6 种

方法中, 细胞培养法和头肾-PHA 活体注射-淋巴细胞分离液富集法完全可以达到上述要求。

以细胞培养法制备的染色体因为细胞类型单一, 几乎没有背景杂质, 分裂指数可达到 6.3%; 染色体形态清晰可辨; 而且结果比较稳定, 重复性好。按照本方法还制备了真鲷胚胎干细胞染色体, 也获得了良好的实验结果 (本实验室未发表资料)。很多文献报道用培养细胞制备染色体操作繁琐^[13,15],

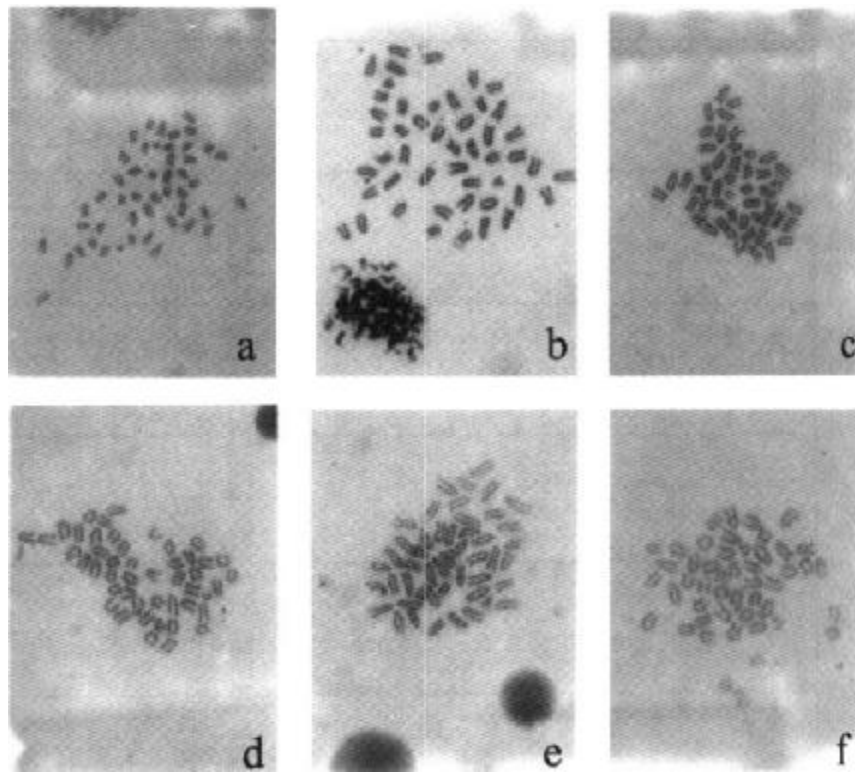


图1 不同方法制备的花鲈染色体

Fig. 1 Chromosome of sea perch prepared by different methods

a. 外周血短期培养法; b. 细胞培养法; c. 头肾-PHA 注射-淋巴细胞富集法; d. 头肾-PHA 注射法; e. 小鱼游泳法; f. 组织浸泡法.
a, Blood culture method; b, Cell culture method; c, Head kidney PHA injection in vivo and lymphocytes enriched method; d, Head kidney PHA injection in vivo method; e, Juveniles swimming method; f, Tissue soaked method.

但笔者认为,随着培养设施的改进、培养基的商品化,培养细胞已变得比较简单。与其他方法相比,用培养好的细胞制备染色体的操作程序并不复杂,而且染色体的制备过程只是一个方面,重要的是结果观察、统计、分析及后续研究的进行是否方便、快捷和准确。用该方法进行染色体组型研究,只需几张片子即可完成结果的统计。

头肾-PHA 注射-淋巴分离液富集法是在 PHA 注射法的基础上改进的鱼类染色体制片技术^[15]。本方法保留了 PHA 在体内外刺激肾细胞分裂增殖的特点,并根据鱼类头肾的结构和功能特点,采用淋巴细胞分离液在合适的转速下,将淋巴细胞和红细胞充分分离,淋巴细胞集中在中层,红细胞被离心到下层,避免了制片时红细胞对染色体的干扰,大大降低了背景杂质。淋巴细胞分离液主要成分是葡聚糖,不会破坏染色体结构,不影响分子杂交结果^[15]。本方法首次应用于海水鱼,与传统的头肾-PHA 注射法相比,在操作步骤上仅仅是增加了收集淋巴细胞

这一步,但却保留了头肾-PHA 注射法简单快捷、适用于实验室和野外现场制备鱼类染色体的优点,分裂指数达到 8.2%,明显高于头肾-PHA 活体注射法的 1.1%;而背景杂质却大大少于传统方法。

外周血短期培养法是较成熟的染色体制备方法,无需长期培养细胞,结果又比较容易获得;特别是使用全血进行培养,只需在尾静脉处抽取少量血液,不会影响鱼的生长状态,可在同一鱼体上获得连续的实验数据;但制片时红细胞的干扰较大,背景杂质较多。小鱼游泳法和组织浸泡法在操作上比较简单,很适合野外现场和条件简陋情况下制备鱼类染色体。尤其是鳍条活组织秋水仙溶液浸泡法,只需剪下鱼的很少一部分鳍组织而不影响其生长。在取材时注意,对于体长小于 5 cm 的小鱼,可直接剪下鳍尖;对于大鱼,使鳍尖产生愈伤组织后再取材效果较好。这 2 种方法分裂指数较低,有时染色体会挤在一起,不够舒展,只适合染色体组型分析和倍性测定。

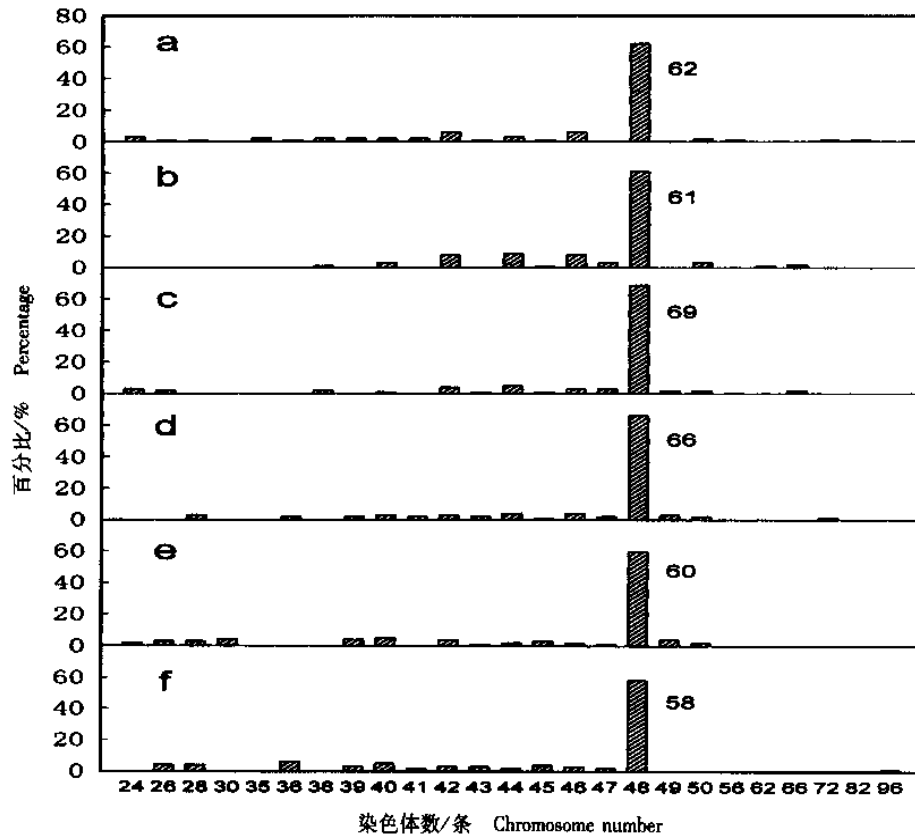


图2 不同方法制备的花鲈染色体频率分布

Fig.2 Frequency distribution of chromosome of sea perch with different chromosome preparation

a. 外周血短期培养法; b. 细胞培养法; c. 头肾-PHA注射-淋巴细胞富集法; d. 头肾-PHA注射法; e. 小鱼游泳法; f. 组织浸泡法。

a, Blood culture method; b, Cell culture method; c, Head kidney PHA injection in vivo and lymphocytes enriched method; d, Head kidney PHA injection in vivo method; e, Juveniles swimming method; f, Tissue soaked method.

不论使用何种方法制备鱼类染色体,都必须注意以下方面:(1)秋水仙素的浓度和处理时间要适中,秋水仙素浓度过低,难以获得较多的分裂相,秋水仙素的浓度过高或处理时间过长,会引起染色体收缩成粒状或短棒状,影响结果分析。处理时间过短,则中期分裂相的染色体较少。(2)低渗处理要得当。低渗液一般使用KCl溶液,浓度范围在37.5~75 mmol/L, KCl处理后的细胞较易破裂,但也会造成染色体的丢失;低渗的时间在室温下不要超过40 min,最佳处理时间为20~30 min。(3)PHA的使用剂量和处理温度等对实验结果影响明显。文献报道^[10,18]PHA的剂量在8~10 $\mu\text{g/g}$ 体重及作用时间在4~36 h对鱼体是安全的,注射次数1次或2~5次^[15],都可显著起到增殖淋巴细胞的作用;PHA

超过20 $\mu\text{g/g}$ 会导致某些鱼类死亡^[10]。对鱼类而言,PHA处理最佳温度为25~33 $^{\circ}\text{C}$ ^[15],笔者在15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用头肾PHA-注射方法制备花鲈染色体,得到的分裂相很少,有丝分裂指数仅为0.3%。另外,滴片方式对实验结果也有一定影响,从本研究结果看,冷滴片的效果好于热滴片。载玻片的洁净程度也很重要,冷、热滴片法都要求载玻片上不能油渍,否则细胞很难附着在载玻片上,不可能产生分裂相。

总之,制备花鲈等海水鱼类的染色体时,要根据实验目的及实验材料的情况确定适合的实验方法。

参考文献:

- [1] 楼允东. 中国鱼类染色体组型研究的进展[J]. 水产学报, 1997, 21(增刊): 83~96.

- [2] Ojima Y S, Hitotsumachi S, Makino. Cytogenetic studies in lower vertebrates[J]. Proc Jap Acad, 1962, 42(1): 62-66.
- [3] 刘凌云. 鲈鱼的白血细胞培养及其染色体组型分析[J]. 北京师范大学学报(自然科学版)1959,3:79-84.
- [4] 吴政安,杨慧一. 鱼类细胞遗传学的研究Ⅱ:鱼类淋巴细胞的培养及其染色体组型分析[J]. 遗传学报,1980,7(4):370-375.
- [5] 周 敏. 鲈鱼染色体组型的研究[J]. 淡水渔业,1980,4:3-7.
- [6] Bonza C, Sanchez L, martinez P. Karyotypic characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) with conventional, fluorochrome and endonuclease-banding techniques[J]. Mar Bio, 1994, 120: 609-613.
- [7] 张念慈,杨广智. 草鱼吻端组织细胞株 2C-7901 及其亚株 2C-7901S1 的建立和特性观察[J]. 水产学报,1980,5(2):111-119.
- [8] Tong S L, Miao H Z, Li H. Three new continuous fish cell lines of SPH, SPS and RSBF derived from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) and red sea bream (*Pagrosomus major*) [J]. Aqu, 1998, 143-151.
- [9] Chen S L, Sha Z X, Ye H Q. Establishment of a pluripotent embryonic stem cell line from sea perch, *Lateolabrax japonicus*, blastula embryos [J]. Aqu, 2003,218:141-151.
- [10] 林义浩. 快速获得大量鱼类肾细胞中期分裂相的 PHA 体内注射法[J]. 水产学报,1982,6(3):201-204.
- [11] 高建民. 鱼类染色体的白细胞 PHA 活体处理制片及其核型观察[J]. 遗传,1986,8(5):42-44.
- [12] 张四明. 一种制备鱼类染色体的新方法[J]. 遗传,1993,15(3):35-36.
- [13] 洪云汉. 鱼类单个胚胎染色体标本的快速制备方法[J]. 淡水渔业,1987,1:35-36.
- [14] 吴政安. 鱼类细胞的培养及其染色体的制备[J]. 动物学杂志,1981,2:50-54.
- [15] 海 燕,黄 晓,易梅生,等. 一种改良的鱼类染色体富集制片方法[J]. 遗传,2001,23(2):151-152.
- [16] 王金星,赵小凡,王相民,等. 鲱形目和鲈形目七种鱼的核型分析[J]. 动物学研究,1994,15(2):76-79.
- [17] 毛连菊,李雅娟. 5种海水鱼类染色体的组型分析[J]. 大连水产学报,2002,17(2):108-113.
- [18] 喻子牛,孔晓瑜,谢宗塘. 真鲷 *Pagrosomus major* 和黑鲷 *Sparus macrocephalus* 的核型及 Ag-NOR 带研究[J]. 青岛海洋大学学报,1993,23(3):107-115.

Comparison of several chromosome preparation methods in sea perch *Lateolabrax japonicus*

SHA Zhen-xia^{1,2}, CHEN Song-lin¹, YE Han-qing^{1,2}, XU Mei-yu¹,
LIU Yang^{1,2}, JI Xiang-shan^{1,3}, TANG Qi-sheng¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Ocean University of China, Qingdao 266071, China; 3. Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Six methods for chromosome preparation in sea perch *Lateolabrax japonicus* were compared in this paper, which included cell culture method, enriched lymphocytes from head kidney-PHA injection in vivo method, blood cell culture method, head kidney-PHA injection in vivo method, juvenile-swimming method and tissue-soaking method. The cultured cells such as embryonic stem cells of *Lateolabrax japonicus* (LJES) were homogeneous single cells, so the high quality chromosome could be obtained by cell culture method. The high division index mitotic metaphases without the interference of the erythrocytes also were gotten when using head kidney-PHA injection and enriched lymphocytes method to prepare chromosome, because the erythrocytes and lymphocytes in the kidney cell suspension of sea perch could be completely separated into distinct layers after the treatment of lymphocytes separation medium. In respect that PHA (phytohemagglutinin) could induce karyokinesis of the lymphocytes both in the blood in vitro and in the head kidney in vivo, by using blood cell culture method and PHA injection method to prepare chromosome, more metaphases could be gotten and the operations could be easily repeated, but the erythrocytes contamination could not be avoided. Less metaphases and more impurities were found in the chromosome slide by the juvenile-swimming method and tissue-soaking method, but these methods were simple for chromosome preparation in the field work and could only be applied to the study of karyotype for its low division index.

Key words: *Lateolabrax japonicus*; chromosome preparation

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn