

牙鲆鳃细胞系染色体组型的变异分析

王旭波, 张全启, 齐洁, 王志刚, 王兴莲

(中国海洋大学 海洋生命学院遗传与种质工程研究室, 山东 青岛 266003)

摘要: 对传代 296 次的牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 鳃细胞系 (FG) 进行染色体制备和组型分析, 并与牙鲆活体鳃细胞组型进行比较。牙鲆活体鳃细胞染色体数目为 48, 且均为端部着丝粒染色体, 染色体组型公式为 $2n=48, 48t, NF=48$ 。而鳃细胞系的染色体数目出现较大变化, 有两个分布区间, 一个区间是 53~79; 另一个是 119~139。其模式染色体数为 68, 在模式细胞分裂相中, 有 30 对端部着丝粒染色体和 4 对中部着丝粒染色体; 染色体条数在 119 以上的分裂相中, 除了有很多中部着丝粒染色体以外, 小染色体也以很高的频率出现。通过上述研究分析表明, 牙鲆鳃细胞系经多次传代后, 其染色体与活体鳃细胞染色体相比存在着明显的差别, 已经发生了变异, 不适合用于牙鲆染色体核型、组型等方面的研究。[中国水产科学, 2008, 15(3): 483-487]

关键词: 牙鲆; 细胞系; 染色体; 组型

中图分类号: Q959.486

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)03-0483-05

鱼类的细胞培养始于 20 世纪 60 年代, 由 Wolf 建立了世界上第一个鱼类细胞系, 即虹鳟 (*Salmo gairdnerii*) 生殖腺细胞系 RTG22^[1]。中国鱼类的细胞培养是 20 世纪 80 年代初由病毒性鱼病研究的展开而开始的。张念慈等^[2-3]成功建立了草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 吻端组织细胞株及其上皮样细胞亚株, 并利用团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 尾鳍组织建立了团头鲂尾鳍细胞系; 洪锡钧^[4]对南方鲇 (*Silurus meridionalis*) 胚胎细胞进行了培养, 建立了上皮型细胞系并对其细胞周期进行了特性检测; 钱华鑫等^[5]先后建立了鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 尾鳍、鳙 (*Aristichthys nobilis*) 吻端、团头鲂尾鳍和银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 囊胚的细胞系, 并获得了鲤 (*Cyprinus carpio*) 和大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 的胚胎细胞系; 童裳亮等^[6]建立了牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 鳃、鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 脾、鲈心和真鲷 (*Pagrus major*) 鳍的细胞系^[6]; 陈松林等获得了来自囊胚期的青鳉 (*Oryzias latipes*)^[7] 和花鲈^[8] 的胚胎干细胞系, 并能成功地分化成各种细胞类型; 孟凡华等^[9]

建立了鳃体细胞系并对其生物学特性进行了分析。鱼类细胞培养技术已成为一种重要的研究手段, 并广泛应用于病毒学、环境毒理学、细胞生物学、遗传学、肿瘤学以及资源保护等方面。在鱼类遗传学研究中, 细胞培养技术为鱼类的染色体研究提供了重要的保证, 为进一步研究染色体的结构、基因定位、荧光原位杂交等奠定了基础^[10]。

关于牙鲆细胞系的建立, 国内外已有多篇报道。Meguro 等^[11]于 1991 年建立了牙鲆鳍细胞系, 童裳亮等^[12]在 1993 年建立了牙鲆鳃细胞系, 2003 年 Kang 等^[13]建立了牙鲆鳍细胞系和脾细胞系, 陈松林等^[14]在 2004 年建立了牙鲆胚胎细胞系, 这些细胞系的建立均为牙鲆遗传学、免疫学、育种学等研究奠定了重要基础。

牙鲆永生性鳃细胞系 (Flounder Gill Cell Line) 于 1993 年 7 月建立, 由牙鲆鳃组织的迁出细胞形成, 目的在于为牙鲆等海水养殖鱼类的病毒性传染病研究提供宿主细胞^[15]。李红岩等^[16]、郭华荣等^[17]、张士瑾等^[18]分别对 FG 细胞系的同工酶和细胞毒素等方面进行了研究, 但是关于此细胞系多次传代后遗传学方面的研究至今未见报道。

收稿日期: 2007-09-12; 修订日期: 2007-11-16.

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2006AA10A404)。

作者简介: 王旭波 (1981-), 男, 博士研究生, 从事鱼类遗传育种研究。E-mail: wangxubo@ouc.edu.cn

通讯作者: 张全启。E-mail: qzhang@ouc.edu.cn

本实验对传代 296 次的 FG 细胞系的染色体组型进行了研究,并与牙鲆活体鳃细胞染色体组型进行了比较,旨在确定 FG 细胞系经长期传代后,染色体组型是否发生了变化,是否可以继续用于牙鲆染色体方面的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 牙鲆 购自青岛市南山水产市场,共 3 尾,体长 40 cm 左右。

1.1.2 牙鲆鳃细胞系 FG-9307 由中国海洋大学童裳亮等于 1993 年建立^[6,15],经多次传代,选用第 296 代进行染色体制备。

1.2 方法

1.2.1 牙鲆活体鳃细胞染色体的制备 将牙鲆鳃丝剪下,置于含 0.1% 秋水仙素的海水中处理 2 h,然后在 0.075 mol/L 的 KCl 溶液中低渗处理 30 min,最后用预冷的卡诺固定液(乙醇与冰醋酸体积比为 3:1)反复固定 3 次,每次固定 20 min。采用空气干燥法制备鳃细胞染色体标本。滴片前将鳃丝置于 60% 的冰醋酸溶液中,用吸管轻轻吹打解离成单细胞,然后滴到加热的载玻片上,空气干燥。用磷酸缓冲液(pH 6.8)稀释的 10% Giemsa 染液染色 10 min,选择清晰的中期分裂相进行染色体观察和计数,并进行显微照相。

1.2.2 FG-9307 细胞系染色体的制备 按左文功等^[19]的培养细胞的染色体制备方法稍加修改。细胞传代培养 1 d 后,加入秋水仙素使其在培养液中的质量分数为 0.005%,处理 2.5 h。用胰酶将细胞从培养瓶底壁消化下来,1 000 r/min (258 g) 离心

5 min 收集细胞。在 0.075 mol/L 的 KCl 溶液中低渗处理 20 min,然后加入预冷的卡诺固定液预固定 15 min,1 000 r/min 离心 5 min 去上清,重复固定 3 次。滴片、染色后,选择清晰的中期分裂相进行染色体观察、显微照相,并进行计数和分析。

2 结果与分析

2.1 牙鲆活体鳃细胞染色体

共观察了 74 个分裂相,其中,染色体数为 48 条的占绝大多数,且均为端部着丝粒染色体,染色体中期分裂相见图 1A。即:牙鲆活体细胞的染色体组型均为 $2n=48,48t, NF=48$ 。

2.2 FG-9307 细胞系染色体

共观察了 257 个分裂相,染色体数目分布见表 1,出现较大浮动,有两个分布区间(图 2),未观察到染色体数目为 48 的分裂相。第一个分布区间的染色体数目为 53~79,这一区间的细胞 223 个,占观察细胞总数的 86.77%,其中染色体数为 65~70 的细胞 171 个,占 76.68%,以染色体数目为 68 的细胞最多,因此其模式染色体数为 68;第二个分布区间的染色体数目约为第一个分布区间染色体数的 2 倍,为 119~139,该分布区有 34 个细胞数,占总数的 13.23%,以染色体数为 136~138 的细胞较多。通过对模式染色体中期分裂相作染色体组型分析表明,有 30 对端部着丝粒染色体和 4 对中部着丝粒染色体(图 1B);而在染色体数目 ≥ 119 条的染色体中期分裂相中,各细胞除拥有数目不等的中部着丝粒染色体以外,还发现了许多数目不等的小染色体或染色体片段(图 1C),这一区间的细胞没有染色体数目集中的分布高峰,也没有固定的组型。

表 1 牙鲆 FG-9307 细胞系染色体计数结果

Tab.1 Chromosome counts in FG-9307 cell line of *P. olivaceus*

项目 Item	染色体数目 Number of chromosome								合计 Total
	53-61	62-70	71-79	74-79	80-118	119-125	126-132	133-139	
分裂相数目 Number of metaphase	10	86	125	2	0	5	9	20	257
所占百分比 % Percentage of metaphase	3.89	33.46	48.64	0.78	0	1.95	3.50	7.78	100

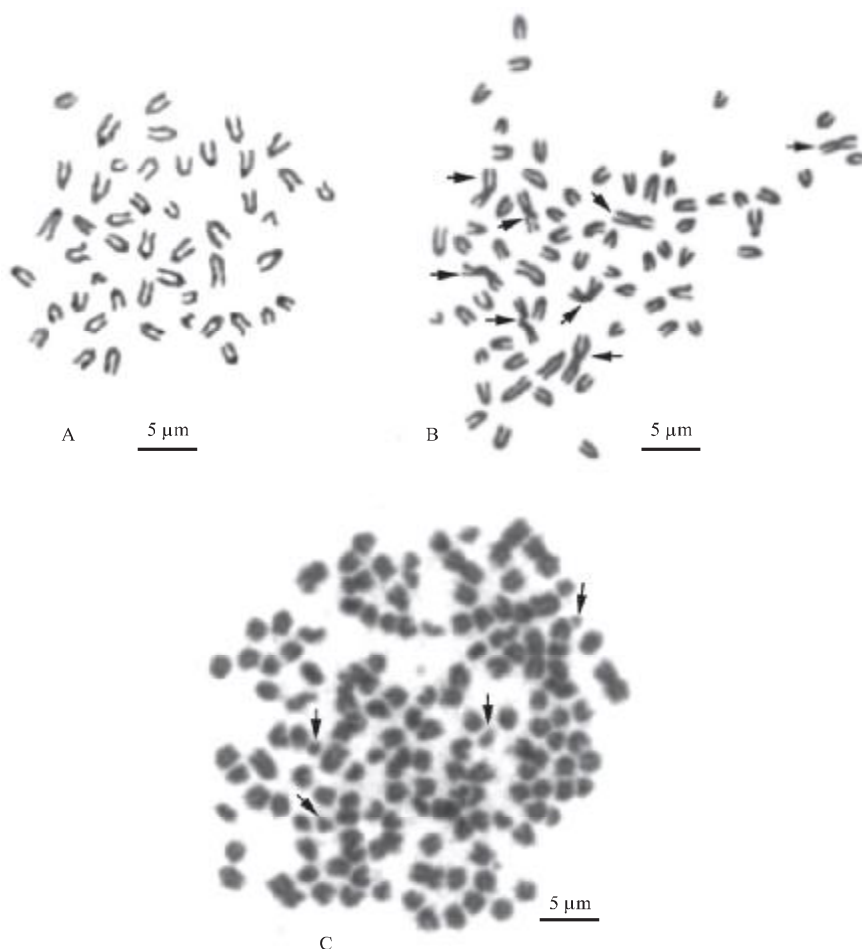


图1 牙鲆活体鳃细胞染色体和FG-9307细胞系染色体中期分裂相

A: 活体鳃细胞染色体中期分裂相, 染色体数为 48; B: FG 细胞系染色体中期分裂相, 染色体数为 68, 箭头所示为 4 对中部着丝粒染色体; C: FG 细胞系染色体中期分裂相, 染色体数为 137, 箭头所示为小染色体。

Fig.1 Metaphase spread from gill tissue and FG-9307 cell line of *P. olivaceus*

A: metaphase spread from living gill tissue showing 48 chromosomes; B: a metaphase spread from FG cell line with 68 chromosomes, the arrows indicate 4 pairs of metacentric chromosomes; C: a metaphase spread from FG cell line showing 137 chromosomes, the arrows indicate microchromosomes.

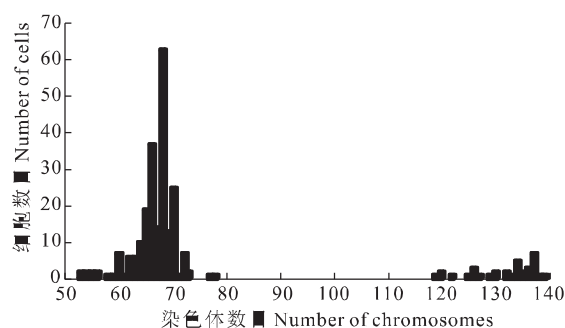


图2 FG细胞系染色体条数分布

Fig.2 Distribution of FG cells with different numbers of chromosomes

3 讨论

大多数鱼类细胞系,在建立后的前几十次传代中,遗传特性都没有明显改变,染色体形态以及模式染色体数也与正常二倍体组型一致。陈松林等^[8]建立的花鲈胚胎干细胞系在第9代时染色体形态和数目与花鲈正常二倍体完全相同;孟凡华等^[9]建立的鲤鱼体细胞系第30代细胞为正常二倍体 $2n=100$,与原代细胞染色体相符。

但是也有一些细胞系在传代过程中,遗传特性可能改变,染色体会自然发生或受环境条件影响发生变异。本研究的结果和已有的报道^[20-22]结果都表明,牙鲆活体细胞染色体组型为 $2n=48,48t$ 。Kang 等^[13]建立的牙鲆鳍细胞系 FFN 和脾细胞系 FSP 经传代 60 次左右,染色体的数目和形态均发生了变化,模式染色体数分别变为 64 和 62,形态也几乎全部成为中部着丝粒染色体。

本研究中所用的牙鲆鳃细胞系 FG-9307 于 1993 年建立^[6,12,15],该细胞系在第 57 代时,染色体数目和组型开始发生变异,出现了部分非整倍体和异倍体,但模式染色体数和染色体组型仍与牙鲆正常二倍体一致^[15]。本研究中所分析的是经传代 296 次后的细胞,与牙鲆的活体鳃细胞及第 57 代的细胞相比,染色体数目和形态发生了明显的变化。在观察的 257 个细胞中,没有一个细胞为 48 条染色体。第一个分布区间的模式染色体数目为 68,约为活体鳃细胞染色体数 ($2n=48$) 的 1.5 倍,并且出现了中部着丝粒染色体。此外,有 13.23% 的细胞染色体数目位于 119~139 之间,染色体数目约为模式染色体数的 2 倍,且分裂相中出现了很多小染色体或染色体片段,这说明 FG-9307 细胞系经长期传代后,遗传特性发生了变化,在变化过程中,染色体可能发生了多次的加倍、易位、断裂等变异,这些变异导致染色体数目的增加、染色体的重排和丢失等。而且从细胞组型的分布看,这些变异可能还未结束,正在向更高的倍性和更复杂的组型分布演化,这些可能的变异将向什么方向发展,还需继续进行追踪观察和研究。

本研究的结果表明,FG-9307 细胞系经过多次传代后,已经成为异倍体和非整倍体系,表现出了复杂多变的染色体结构,这些细胞显然已不能作为细胞遗传学研究的工具。同时,由于这些变异包含了染色体的重排和断裂丢失等,利用这类细胞作为

病毒载体进行免疫学等研究是否合适,还有待于进一步的研究和证实。

参考文献:

- [1] Wolf K. Physiological salines for freshwater teleosts[J]. Science, 1962, 135: 1 065-1 066.
- [2] 张念慈,杨广智. 草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901S1 的建立和生物学特性观察[J]. 水产学报, 1981, 5(2): 111-119.
- [3] 张念慈,尹文林. 团头鲂尾鳍细胞系 TQ-8801 的建立[J]. 科技通报, 1991, 7(2): 87-89.
- [4] 洪锡钧. 南方鲇胚胎细胞培养及其细胞周期特性检测[J]. 水产学报, 1995, 21(3): 240-245.
- [5] 钱华鑫,曾勇,王凯,等. 淡水鱼类细胞库的构建[J]. 中国水产科学, 1995, 2(5): 119-123.
- [6] 童裳亮,李宏. 牙鲆、鲈鱼和真鲷的四个永生性细胞系建立[J]. 生物工程进展, 1997, 17(3): 3-4.
- [7] Hong Y H, Gui J F, Chen S L, et al. Embryonic stem cells in fish[J]. Acta Zoologica Sinica, 2003, 49(3): 281-294.
- [8] Chen S L, Sha Z X, Ye H Q. Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos[J]. Aquaculture, 2003, 218: 141-151.
- [9] 孟凡华,尹洪滨,孙中武,等. 鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 体细胞系的建立及其生物学特性分析[J]. 实验生物学报, 2005, 38(1): 80-84.
- [10] 杨先乐. 鱼类组织培养的回顾与展望[J]. 水产学报, 1999, 23(Suppl.): 74-81.
- [11] Meguro Y, Nakai T, Muroga K, et al. A cell line derived from the fin of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Gyobyo Kenkyu, 1991, 26(2): 69-75.
- [12] 李宏,童裳亮. 牙鲆的组织培养与鳃细胞系的获得[J]. 水产学报, 1997, 21(2): 193-196.
- [13] Kang M S, Oh M J, Kim Y J, et al. Establishment and characterization of two new cell lines derived from flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel) [J]. Fish Dis, 2003, 26: 657-665.
- [14] Chen S L, Ren G C, Sha Z X, et al. Establishment of a continuous embryonic line from flounder (*Paralichthys olivaceus*) for virus isolation[J]. Dis Aquatic Organ, 2004, 60: 241-246.
- [15] Tong S L, Li H, Miao H Z. The establishment and partial characterization of a continuous fish cell line FG-9307 from the

- gill of flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 1997, 156: 327-333.
- [16] Li H Y, Zhang S C. In vitro cytotoxicity of the organophosphorus pesticide parathion to FG-9307 cells [J]. Toxicol in Vitro, 2001, 15: 643-647.
- [17] Guo H R, Zhang S C, Li H Y, et al. Characterization of lactate dehydrogenase isozyme pattern and morphology of three marine fish cell lines [J]. Chin J Oceanol Limnol, 2002, 20 (3): 226-231.
- [18] Su F, Zhang S C, Yang M, et al. In vitro acute cytotoxicity of the neonicotinoid insecticide acetamiprid to FG cells, the gill cell line of flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2006, 25 (5): 135-140.
- [19] 左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 草鱼肾组织细胞系 CIK 的建立及其生物学特性 [J]. 水产学报, 1986, 10 (1): 11-17.
- [20] Kikuno T, Ojima Y, Yamashita N. Chromosome of flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Jpn Acad Sci, 1986, 62 (13): 194-196.
- [21] 喻子牛, 孔晓瑜, 谢宗墉, 等. 山东近海 21 种经济鱼类的核型研究 [J]. 中国水产科学, 1995, 2 (2): 1-6.
- [22] 戈文龙, 张全启, 齐洁, 等. 异源精子诱导牙鲆雌核发育二倍体 [J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35 (6): 1 011-1 016.

Variation analysis of karyotypes of flounder *Paralichthys olivaceus* gill cell line

WANG Xu-bo, ZHANG Quan-qi, QI Jie, WANG Zhi-gang, WANG Xing-lian

(Laboratory of Marine Genetics and Breeding (MGB), College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The karyotypes of flounder *Paralichthys olivaceus* gill and flounder gill cell line (FG) which had been subcultured for 296 generations were analyzed and compared with that of live gill cell of *P. olivaceus*. The chromosomes of flounder gill were all acrocentric chromosomes and the chromosome number was 48; the karyotype formula was $2n=48, 48t, NF=48$. The chromosome number of FG cell line fluctuated largely. Two interval distribution were identified: one was from 53 to 79, and the other was from 119 to 139. Its modal chromosome number was 68, and the metaphase chromosomes of modal cells included 4 pairs of metacentric chromosomes and 30 pairs of acrocentric chromosomes. Among the metaphases whose chromosome numbers were more than 119 many metacentric chromosomes were detected, and microchromosomes were also found at a high frequency. The results showed that after subcultured for many generations the flounder gill cell line chromosomes had changed apparently compared to flounder gill; the cell line had undergone cell transformation and karyotype evolution, and the chromosomes of FG cell line could not be used for chromosome research of flounder *P. olivaceus*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (3): 483-487]

Key words: *Paralichthys olivaceus*; cell line; chromosome; karyotype

Corresponding author: ZHANG Quan-qi. E-mail: qzhang@ouc.edu.cn