

用于倍性检测的对虾样品的保存方法*

张成松 李富花 周岭华 相建海

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 采用9种保存方法分2个温度梯度,对待测倍性的日本对虾幼体样品进行处理,通过对利用流式细胞仪检测的不同样品直方图进行比较,筛选出一种较为理想的用于倍性检测的对虾样品的保存方法。结果表明:新鲜样品在分散液中捣碎,加入一定量的二甲基亚砜(DMSO)后可在 -20°C 下保存较长时间。

关键词 保存方法, 倍性检测, 流式细胞仪, 对虾

中图分类号 Q31 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)05-0001-04

动物细胞倍性检测有多种方法,包括染色体直接计数、流式细胞仪测定、细胞核体积测量、荧光密度测定以及核仁计数等。近年来,利用流式细胞仪快速检测染色体的倍性在水产动物多倍体育种中得到越来越广泛的应用^[1-3]。国内自90年代末期将流式细胞仪技术开发应用于水产养殖动物如虾、贝的倍性育种研究中^[4,5],从而加速了虾贝类倍性育种研究的进程,促进了水产养殖动物三倍体育种的产业化。流式细胞仪测定染色体倍性具有及时、快速、准确的特点。由于对虾染色体数目多、体积小、染色体计数困难,再加上对虾特殊的繁殖生物学特点,有关对虾多倍体诱导的研究在国际上是一个难题。流式细胞仪技术在对虾倍性检测中的应用^[1],大大加速了对虾多倍体诱导研究的进程。由于流式细胞仪价格昂贵,一般生产单位往往不具备测试条件,实验样品不能马上进行检测,因而寻找一种合适的样品保存方法,将用于倍性检测的样品加以保存,以便日后进行检测分析就显得十分必要。贝类中曾有此类研究^[6],但在虾类尚未见报道。本文通过流式细胞仪测定、比较,对几种对虾样品保存的方法进行了比较筛选。

1 材料和方法

1.1 材料的处理

实验用的对虾样品取自中国科学院海洋研究所水族楼实验室人工培育的日本对虾(*Penaeus japonicus*)糠虾幼体。共采用了9种保存方法,标为A~I。保

存温度为 -20°C 和 -70°C 。A:新鲜样品,在本实验室发展的对虾细胞分散液^[4](0.5 mL)中捣碎。B:新鲜样品,70%乙醇(2 mL)固定20 min后,磷酸缓冲液(PB, pH=7.2)洗2次,加入分散液(0.5 mL)捣碎。C:新鲜样品,Carnoy氏液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定15 min, PB洗2次,加入0.5 mL分散液捣碎。D:新鲜样品,在0.5 mL分散液中捣碎,加入0.2 mL二甲基亚砜(DMSO)。E:新鲜样品,在0.5 mL分散液中捣碎,加入0.4 mL DMSO。F:新鲜样品,在0.5 mL PB中捣碎。G:新鲜样品,在0.5 mL PB中捣碎,加入0.2 mL DMSO。H:新鲜样品,在0.5 mL PB中捣碎,加入0.4 mL DMSO。I:新鲜样品,在2 mL Carnoy氏液中固定15 min, PB洗2次,加入0.5 mL PB捣碎。对照:同A处理方法。

将用以上A~I 9种方法处理的样品分别置于 -20°C 和 -70°C 下保存过夜(约18 h),次日分析检测,对照样品处理后直接分析检测。将以上9种保存方法分析的结果与新鲜样品组织直接检测效果进行比较,筛选出几种比较好的方法;用筛选出的方法处理样品,分别在 -20°C 和 -70°C 下保存,并设置5, 10, 15 d三

* 国家重点基础研究资助项目G1999012009号。

第一作者:张成松,出生于1977年,硕士研究生,现从事对虾生殖与遗传学研究。Email:csongzhang@sohu.com

收稿日期:2002-04-23; 修回日期:2002-07-23

个时间梯度,通过流式细胞仪检测,筛选出一种较为理想的保存细胞的方法。

1.2 样品的分析

将冷冻保存的样品取出,室温溶化后加入适量 DAPI 染色 30 min 左右,用西德 Partec CCA II 型流式细胞仪进行样品分析。分析方法同文献[4]。

2 结果与讨论

2.1 结果

对用 A~I 9 种处理方法保存过夜的样品通过流式细胞仪进行检测的直方图进行比较,发现用于保

存过夜(约 18 h)的样品的处理方法,以在分散液中捣碎(A)、分散液中捣碎加入 0.2 mL DMSO(D)、分散液中捣碎加入 0.4 mL DMSO(E) 的保存效果为好,保存温度为 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 均可,其中以在分散液中捣碎,加入 0.2 mL DMSO 保存(D),效果最为理想(图 1),此时的测定结果与新鲜组织直接测定结果(图 2)基本无差别;将样品放在 Carnoy 氏液中固定 15 min 后,经磷酸缓冲液(PB)冲洗,再在分散液中捣碎(C)以及将样品在磷酸缓冲液中捣碎(F)后在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜(约 18h)有时也能得到较好的测定结果,但不稳定(图 3)。其他样品处理保存方法(B, G, H, I)

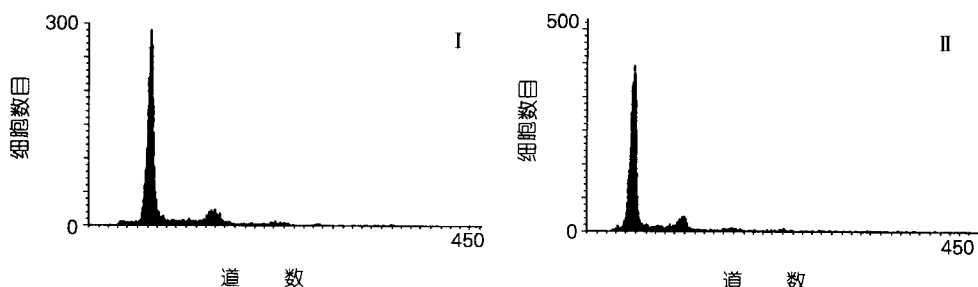


图 1 优选保存方法过夜的样品检测直方图

I: A 法 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$; II: D 法 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Fig. 1 Histograms of samples preserved overnight under different temperature with selected methods

I: $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for method A; II: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for method D

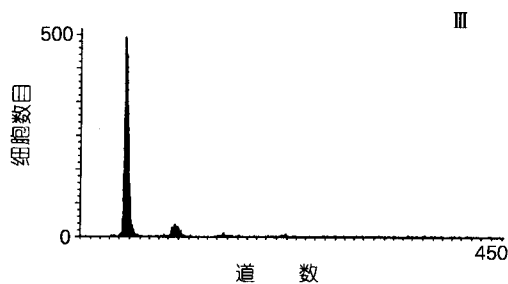


图 2 新鲜样品组织直接检测效果直方图(III)

Fig. 2 Histogram of the fresh shrimp sample detected immediately

均不能很好地保存细胞,在进行流式细胞仪检测时,不能检测到明显的峰(图 4)。

将保存过夜测定效果比较好的样品保存方法

(A, D, E)处理的样品在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存不同时间(5, 10, 15 d)后,经流式细胞仪测定发现,只有处理方法 D(分散液中捣碎,加入 0.2 mL DMSO)在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存效果较好。若保存温度过低($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$),则无法检测到明显的峰(图 5)。其他处理方法处理的样品无论是在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 还是 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 5 天后就不能检测到明显的二倍体峰。

2.2 讨论

2.2.1 样品的处理方法对分析结果的影响

将活体组织在分散液中捣碎,DAPI 染色后直接用流式细胞仪检测倍性,是目前动物倍性检测中最快速、最简便常用的方法,尤其是对于染色体数目比较大的虾蟹类来说,用流式细胞仪检测倍性的优势更为突出。如何通过流式细胞仪获得准确可靠的结果,首先需要解决样品的处理和保存问题。周岭华等^[1]发展了适合于虾类细胞分散,用于流式细胞仪检测的分散

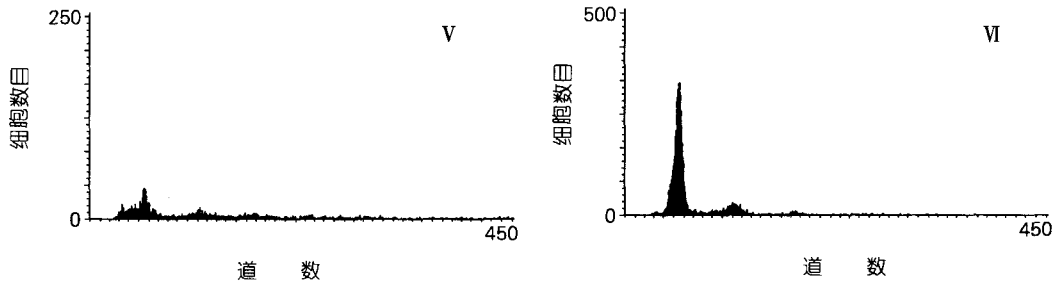


图3 某些保存效果不稳定的过夜样品检测直方图

V: C法 - 20℃; VI: C法 - 70℃

Fig. 3 Histograms of samples preserved overnight with method C in two temperature levels

V: -20℃ for method C; VI: -70℃ for method C

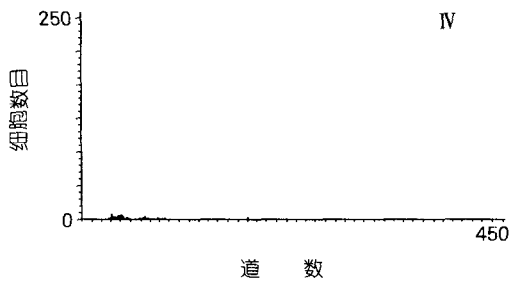


图4 某些保存效果较差的过夜样品检测直方图

IV: H法 - 70℃

Fig. 4 Histogram of samples preserved overnight with method H at -70℃

H at -70℃

IV: -70℃ for method H

液, 并首次将流式细胞仪技术用于虾类倍性检测, 解决了对虾多倍体诱导过程中倍性快速检测的困难, 从而加速了对虾染色体组操作的进程。在现场没有流式细胞仪, 不能马上检测染色体倍性的情况下, 采用合适的处理方法防止细胞的破碎, 完整地保存单个细胞是日后利用流式细胞仪检测的关键, 否则细胞的染色体倍性检测将难以进行。

2.2.2 样品的保存温度和保存时间对检测结果的影响 并非样品的保存温度越低, 样品保存效果越好。在保存过夜(约 18 h)的情况下, 处理方法 A, D, E 在 -20℃ 和 -70℃ 下均能很好地保存样品, 得到清晰的直方图。但在保存时间较长的情况下, -70℃ 的保存效果明显不好, 原因可能是由于温度过低, 引

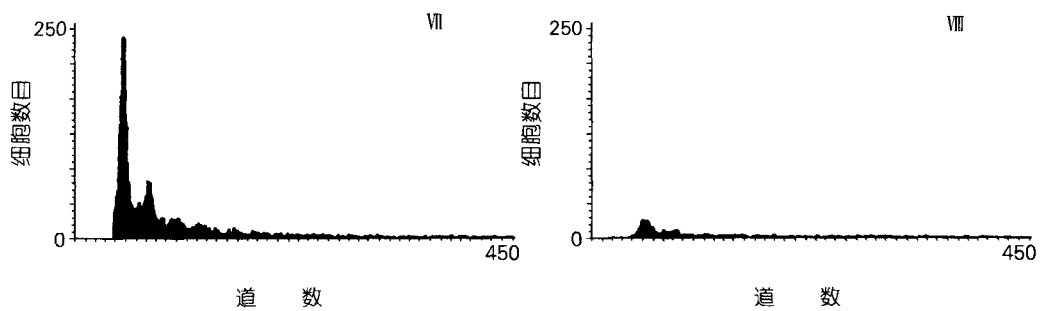


图5 15天后温度对优选方法保存的样品检测直方图的比较

VII: D法 - 20℃; VIII: D法 - 70℃

Fig. 5 Comparison of histograms of samples preserved with selected method for 15 days in two temperature levels

VII: -20℃ for method D; VIII: -70℃ for method D

起细胞的破碎更加严重。在保存时间较长的情况下,抗冻剂的加入起着关键性作用,当然所加抗冻剂的量对保存效果作用也很大。

2.2.3 单细胞悬浮液制备方法对分析结果的影响 不同的单细胞悬浮液制备方法对细胞的完整性影响差异较大,不恰当的制备方法会导致细胞碎片的增多。而样品的碎片杂质过多会影响DNA的测定,如所测细胞占20%以下,则直方图无效^[4]。在以往的对虾倍性检测中,作者曾比较了研磨、剪碎和挤压对分析效果的影响,结果发现:将样品先剪为几段再轻轻挤压,可得到分散良好的单细胞悬浮液,细胞碎片较少,峰尖,变异系数(CV值)小;仅靠剪碎则不能得到足够的细胞浓度,峰不明显;而研磨则会引起细胞碎片的增多,所得的峰较杂,较宽,变异系数偏大,可信度低。因此,在制备单细胞悬浮液时,尽量避免细胞

碎片的产生就显得非常重要。

参考文献

- 1 Allen S K Jr. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture*, 1983, 33(1-4): 317-328
- 2 Lecommandeur D, Haffray P, Philippe L. Rapid flow cytometry method for ploidy determination in salmonid eggs. *Aquacult Fish Manage*, 1994, 25(3): 345-350
- 3 Yang H P, Gallivan T, Guo X M. A method for preserving oyster tissue samples for flow cytometry. *Journal of Shellfish Research*, 2000, 19(2): 835-839
- 4 周岭华, 邓田, 张晓军, 等. 利用流式细胞计进行虾类倍性检测的研究. *海洋科学*, 1999, 23(2): 42-45
- 5 丁君, 张国范. 用流式细胞仪检测活体鲍倍性. *水产科学*, 2000, 19(6): 13-16

A PRESERVING METHOD FOR PLOIDY DETECTION OF SHRIMP SAMPLES

ZHANG Cheng-Song LI Fu-Hua ZHOU Ling-Hua XIANG Jian-Hai
(*Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Science, Qingdao, 266071*)

Received: Apr., 23, 2002

Key Words: Preserving method, Ploidy detection, Flow cytometry, Shrimp

Abstract

Shrimp samples prepared for ploidy detection were treated with nine varieties of methods and preserved under two temperature levels for different duration. Good preservation method for shrimp ploidy detection was selected out through comparison of histograms obtained by flow cytometry. The results showed that the samples which were crushed in dispersion fluid with addition of certain amount of DMSO could be preserved for long time under $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ than those using other varieties of methods.

(本文编辑:刘珊珊)