

日本沼虾染色体倍性检测技术的研究

汪财生,尹尚军,钱国英,朱秋华

(浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100)

摘要: 用流式细胞仪分别对日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 正常二倍体的体细胞和四倍阶段体胚胎的 DNA 相对含量和细胞频率进行了测定,以研究日本沼虾染色体倍性检测技术。以日本沼虾正常二倍体的体细胞液进样所得直方图为标准,用对细胞松弛素 B 人工诱导的日本沼虾四倍体胚胎进行 DNA 相对含量和细胞频率的测定,测试结果以直方图表示,并用染色体涂片镜检结果进行倍性核对。结果表明,日本沼虾二倍体和四倍体的 DNA 相对含量有显著差异,四倍体日本沼虾的 DNA 相对含量是二倍体的 2 倍。用流式细胞仪法检测日本沼虾倍性,方法简单、测试速度快、结果可靠。

关键词: 流式细胞仪; 日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*); 染色体; 倍性检测
中图分类号:Q33.2 文献标识码:A 文章编号:1000-3096(2006)07-0005-04

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*), 又名青虾, 营养价值高, 风味独特, 在中国是个体较大的一种主要淡水经济虾类。但近年来由于多种原因, 其天然的优良生长性能与商品性状发生严重退化。人工诱导多倍体是改良养殖动物品种的一种有效的方法, 一种精确、快速测试的染色体倍性检测技术, 是多倍体育种急需解决的问题。

流式细胞仪是 20 世纪 70 年代末发展起来的一种能快速、准确测定细胞大小、DNA、RNA、蛋白质以及抗原等物质的高技术仪器。其原理是将被测细胞用荧光染料染色, 荧光物质与 DNA 特异性结合, 被染色的细胞被照射激发后, 发射出一定波长的荧光, 且荧光强度与细胞所含的荧光染料即 DNA 相对含量成正比, 再用流式细胞仪测出荧光值, 并绘出频率曲线, 从而可清楚地显示出样品中各种特性细胞的比例^[1]。该仪器已被应用于对各种水产多倍体细胞的检测^[2-11], 但在日本沼虾染色体倍性检测的应用, 尚未见报道。

在日本沼虾四倍体诱导研究工作的基础上, 作者用流式细胞仪对二倍体日本沼虾胚胎的染色体和诱导的四倍体胚胎的染色体进行检测, 比较其染色体倍性和各细胞出现的频率, 探索流式细胞仪在日本沼虾多倍体诱导中的染色体倍性检测技术, 为开展多倍体育种提供重要技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

日本沼虾亲本采自绍兴狭湖外荡水域。分别以未进行倍性处理的二倍体胚胎、二倍体体细胞和进行倍性处理的四倍体细胞为检测材料。二倍体多细胞期胚胎直接取自自然交配的抱卵虾。多倍体胚胎是用雌雄亲虾按 1:2 比例并箱促产, 让其自然交配产卵的受精卵, 在第一次卵裂中期经细胞松弛素 B 诱导处理的多细胞期多倍体日本沼虾胚胎。

1.2 样品制备

取单个胚胎, 置于离心管中, 用吸管轻轻吹打, 使细胞分散。加入 50% 的醋酸和适量的 DAPI(10 mg/L) 染色液, SK-1 快速振荡仪振荡 3~5 min, 用 20~40 μm 的小筛网过滤得细胞悬液于样品管中, 使最终样品管中的体积达到 1.5~2.0 mL, 样品细胞的最终浓度为 $10^5\sim 10^6$ 个/mL^[12,13]。

1.3 流式细胞记数法

使用德国产 Partec PAS- 流式细胞仪进行样品

收稿日期: 2005-06-03; 修回日期: 2006-02-20

基金项目: 浙江省重点攻关项目 (2003C22012)

作者简介: 汪财生 (1968-), 男, 浙江杭州人, 实验师, 主要从事生物技术类实验教学与科研工作; 钱国英 (1961-), 通讯作者, E-mail: qiangy@zww.edu.cn

分析,液流的细胞流速一般为 100~150 个/s,测试结果以直方图表示。每个样品至少测定 10×10^4 个细胞,重复 2 次,以获得较好的峰值图谱。

1.4 染色体涂片核对

用染色体涂片镜检的方法,对二倍体胚胎和四倍体胚胎的染色体数进行计数,用以倍性鉴定的对照。用 500 $\mu\text{g/L}$ 秋水仙碱于 20 下对多细胞期胚胎培养 1h,在 37 水浴锅中用 0.1 mol/L 的 KCl 低渗溶液处理 40~50 min,移去低渗液,缓慢加入预冷的卡诺氏固定液,4 下静止 1 h,其间更换固定液 2 次。然后改用 1:1 的甲醇和冰醋酸液固定。制片时,取单个胚胎置于载玻片上,滴上 1~2 滴 50% 醋酸使其软化,并除去部分卵黄物质。日产 Olympus 显微镜下镜检并拍照。

2 结果与讨论

流式细胞仪对二倍体胚胎核 DNA 相对含量测定的结果见图 1,四倍体胚胎核 DNA 相对含量测定的结果见图 2。图 1、图 2 中均有两个峰,其中一个 DNA 相对含量较低,细胞频率高的是有丝分裂中 G0-G1 期的细胞,另一个 DNA 相对含量高,细胞频率较低的是 G2-M 期的细胞。比较未进行倍性处理的二倍体胚胎、二倍体体细胞的 DNA 相对含量与四倍体细胞的 DNA 相对含量(图 3),可以看出,四倍体细胞的 DNA 相对含量是二倍体的 1.92~2.03 倍。一般地,在流式细胞术中,DNA 的相对指数在 1.9~2.1 之间可认为是近四倍体细胞。

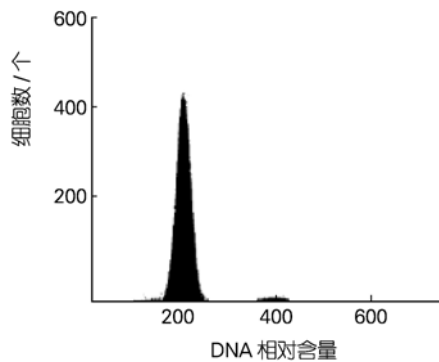


图 1 二倍体青虾 DNA 相对含量

Fig.1 The DNA relative content of diploid *M. nipponense*

用染色体涂片镜检的方法,对 25 张胚胎标本,分别挑选 92 个和 117 个分裂相较好二倍体胚胎和四

倍体胚胎进行观察,其染色体数进行计数的结果表明,青虾的二倍体染色体数约为 104 左右(表 1,图 4a),四倍体的染色体数为 208 左右(图 4b)。流式细胞仪对胚胎细胞核的 DNA 相对含量测定结果与染色体涂片的镜检结果相符。

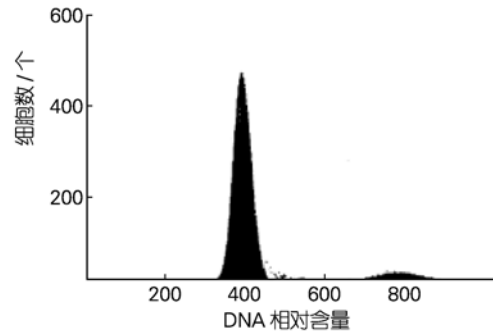


图 2 四倍体青虾 DNA 相对含量

Fig.2 The DNA relative content of tetraploid *M. nipponense*

多倍体倍性检测是多倍体育种的重要环节。目前,多倍体的倍性检测主要方法有染色体计数法、极体计数法、核体积法、电泳法、显微荧光和流式细胞仪测定法等^[14]。与其它方法相比,流式细胞仪检测法具有诸多优点:制样简单,被固定的组织可以在低温下短期储藏,而不会影响结果,这对短期内需要进行大量样品测定的情况下是很有意义的^[1];检测结果快速、准确,一个样品只需要 1~2 min 就可以得到结果;检测样品量大,结果较为可靠。

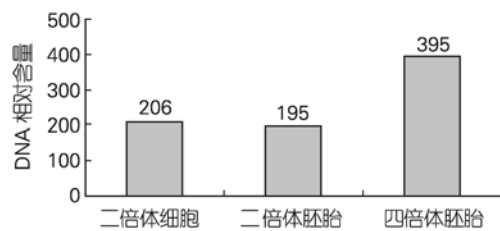


图 3 DNA 相对含量比较

Fig.3 The comparison in the DNA relative content

由于青虾卵属于均黄卵,胚胎内卵黄量多,如不经处理,会影响对染色体的观察与计数。本试验发现,



将胚胎置于离心管中,用吸管轻轻吹打,使细胞分散,最后通过水和固定液之间的交换作用使染色体分散得更开,可大大减少卵黄的干扰;但若处理不当,如用力过大,吹打时间过长,造成染色体太分散,多个细胞的染色体便混杂在一起,难以区别。在材料预处理中,加滴 50% 的醋酸,有利于去除卵黄,以清晰染色体背景。这种方法在两栖类和中国明对虾胚胎染色体标本制备中也用过,效果较好^[15]。但过多的醋酸会破坏染色体形态,引起染色体过度膨胀。为避免染色体过度膨胀,可在最后固定液中加大甲醇比例,

使染色体浓缩。另外须注意,胚胎细胞膜薄,KCl 和蒸馏水渗透快,不均匀,易造成细胞破碎,本实验中用河水代替蒸馏水进行稀释和冲洗,可有效地防止细胞破碎。

本实验结果表明,用流式细胞仪对日本沼虾染色体倍性检测是准确可靠的,可作为日本沼虾活体染色体倍性检测方法。本试验已取日本沼虾步足作为检测材料进行了尝试,结果表明可作为活体染色体倍性检测的材料。这一结果将为多倍体育种活体染色体倍性检测带来福音。

表 1 日本沼虾胚胎染色体数出现频率

Tab. 1 Frequency of chromosome number of embryo cells in *M.nipponense*

二倍体			四倍体		
染色体数	出现次数	出现频率 (%)	染色体数	出现次数	出现频率 (%)
64	1	1.09	168	1	0.8
70	2	2.17	185	0	0
80	5	5.43	190	2	1.7
92	4	4.35	195	4	3.4
96	5	5.43	200	3	2.56
98	6	6.52	202	0	0
100	2	2.17	204	2	1.7
102	8	8.70	206	8	6.83
104	56	60.87	208	94	80.3
106	2	2.17	210	2	1.7
108	1	1.09	216	1	0.8
总计	92	100	总计	117	100

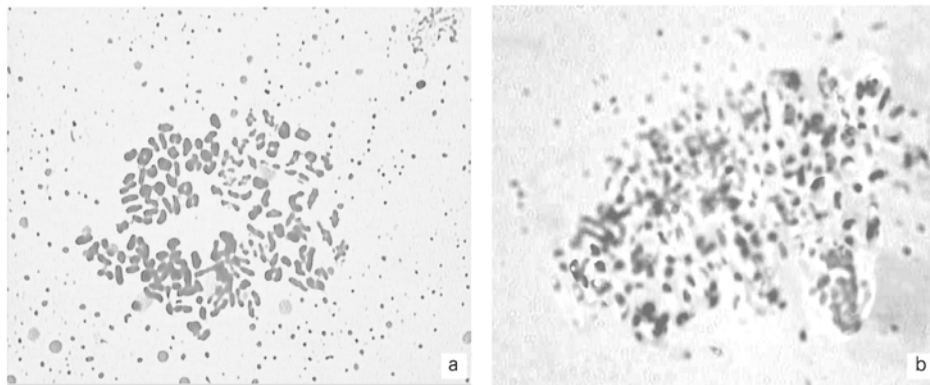


图 4 胚胎细胞染色体中期分裂相 ($\times 1000$)

Fig. 4 Mitotic metaphase chromosome of embryo cells using the cell low-osmosis method ($\times 1000$)

a : $2n=104$; b : $4n=208$



参考文献:

- [1] 阎学春, 孙效文. 利用流式细胞仪鉴别转基因鲤鲫杂交回交子代的倍性[J]. 水产学杂志, 2000, 13(1):24-29.
- [2] 曾勇. 大口牛胭脂鱼中天然体细胞倍性嵌合体的发现[J]. 水产学报, 1999, 23(增刊):90-91.
- [3] Thorgaard G H. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. *Aquaculture*, 1982, 29:305-309.
- [4] Benfey T J, Liang J. Chromosome studies in *Bufo bufo gargarizans*[J]. *Trans Am Fish Soc*, 1986, 115(6):838-840.
- [5] Allen S K. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish[J]. *Aquaculture*, 1983, 33(1-4):317-328.
- [6] Aldridge F J, Yuko Okamoto. Meiotic chromosome complements and nuclear DNA contents of four species of shrimps of the genus *Penaeus*[J]. *Aquaculture*, 1990, 87(2): 121-131.
- [7] Ye Y Z, Wu Q J. Relative DNA content measurement and ploidy analysis of artificial multiple triploid carp and its three parental forms[J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 1998, 22(2):119-122.
- [8] Zhou L H, Deng T, Zhang X J, *et al.* Detection of ploidy in shrimp by flow cytometry[J]. *Marine Sciences*, 1999, 2:42-45.
- [9] Li Y, Zheng X D, Wang Z P. Comparison of cell nuclear DNA content among different tissues in Pacific oyster[J]. *J Ocean Univ Qingdao*, 1999, 29(3):453-456.
- [10] Hinegardner R. Cellular DNA content of the Mollusca[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1974, 47A:447-460.
- [11] Hiroshi Ieyama. Chromosomes and nuclear DNA content of *Limnoperna* in Japan (Bivalvia: Mytilidae) [J]. *Venus*, 1996, 55(1):65-68.
- [12] 丁君, 张国范. 用流式细胞仪检测活体鲍倍性[J]. 水产科学, 2000, 19(6):14-16.
- [13] 李雅娟, 毛连菊, 王子臣, 等. 三倍体皱纹盘鲍活体倍性检测[J]. 水产科学, 2003, 27(5):425-430.
- [14] Li N. The application of polyploid breeding to seashell culture[J]. *Transactions of Ocean*, 1992, 4(2):80-83.
- [15] 刘萍, 麦明, 孔杰, 等. 中国对虾染色体制备及染色体形态的研究[J]. 海洋科学, 1994, 1:33-36.

Detection of cellular DNA content in *Macrobrachium nipponense*

WANG Cai-sheng, YIN Shang-jun, QIAN Guo-ying, ZHU Qiu-hua

(College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315101, China)

Received: Jun., 3, 2005

Key words: flow cytometry; *Macrobrachium nipponense*; chromosome; ploidy determination

Abstract: To study the technology of ploidy determination of *Macrobrachium nipponense*, the flow cytometry was used to measure the DNA relative content and cell frequency of diploid somatic cell and tetraploid embryonic cell from *Macrobrachium nipponense*. The results were standardized by histogram. Comparing the DNA relative content and cell frequency between normal diploid somatic cells and tetraploid embryo, which was induced by Cytochalasin B or by cold-heat shocks, from *Macrobrachium nipponense*, it was shown that there is a strong correlation between the DNA relative content and ploidy. The DNA relative content in tetraploid embryo was twice as much as that in diploid somatic cells from *Macrobrachium nipponense*. It was concluded that using flow cytometry to measure the DNA relative contents is a simple, fast, and reliable method of ploidy determination in *Macrobrachium nipponense*. (本文编辑: 刘珊珊)