

中国对虾染色体制备及染色体形态的研究

刘 萍 麦 明 孔 杰 王清印 杨丛海

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266003)

提要 以中国对虾原肠期胚胎为材料,采用整体低渗法和管渗法均制备了染色体。通过比较发现,管渗法制备的染色体比整体低渗法的形态好。本文对制备中国对虾染色体技术方面的问题进行了探讨。通过作者的观察,了解到中国对虾染色体除正常特征外,还存在较特别的形态特征,如主缢痕增强,次缢痕变化,同源配对等。并对产生这些形态特征的原因进行了解释。

关键词 中国对虾,染色体,整体低渗法,管渗法

为了对中国对虾染色体做进一步的研究。为品种改良打基础,在1990年春季4~5月间,我们以中国对虾胚胎为研究材料进行了染色体制备方法和染色体形态方面的研究。

1 材料与方方法

1.1 材料

研究用的亲虾来源于黄海水产研究所太平角实验场。亲虾产卵后,将受精卵取出,放入1 000ml烧杯中。在解剖镜下观察,当受精卵发育到原肠期时,将胚胎移到含有秋水仙素的海水溶液中。处理1.5~2 h。秋水仙素的最终浓度为100 μ g/ml。

1.2 方法

1.2.1 整体低渗法 取一定数目秋水仙素处理过的胚胎放到海水:蒸馏水为1:3的低渗溶液中处理20min。弃低渗溶液加入甲醇:冰乙酸为3:1的固定液固定15min。再用同样固定液固定2次。4 $^{\circ}$ C冰箱过夜。第2天弃旧固定液加入甲醇:冰乙酸为4:1的固定液,固定15min。用小口径吸管小心吸取几个处理好的卵子于载玻片上,用吸水纸吸去多余的固定液。再加一定量的50%醋酸。将载玻片放在60 $^{\circ}$ C温台上,当看到50%的醋酸马上干时,再滴加甲醇:冰乙酸为4:1的固定液。空气干燥制法, Giemsa 染色。

1.2.2 管渗法 取一定数目秋水仙素处理过的卵子,加一点海水洗去多余的秋水仙素。吸去多余的水份以后,通过机械压力把胚胎压开,加海水冲洗,用滴管将细胞液吸入10ml离心管中, 1 000r/min 离心5min,弃上清液。加5ml 低渗液(海水:蒸馏水为1:3)于离心管中,用吸管轻轻吹打,室温下低渗处理8min。1000r/min 离心5min。弃低渗液,加固定液5ml(甲醇:冰乙酸为3:1)固定5min。

收稿日期 1992年6月21日

1994年第1期

33

同样方法固定2次。4℃冰箱过夜。第2天1 000r/min 离心5min,弃过夜固定液,加一定量的固定液(甲醇:冰乙酸为4:1)。使细胞液达到一定浓度,取冰冻玻片,滴片,空气干燥法制片,Giemsa 染色。

2 结果

2.1 两种制片方法的对比

上述两种方法均可以制备出中国对虾染色体。试管低渗透法制备的染色体效果要比整体低渗法好些(见图版2.4)。比较见表1。

表1 两种方法制备染色体的比较

Tab. 1 Comparison of two methods of preparing chromosome

比较项目	整体低渗法	试管低渗法
分散程度 背景 染色体形态	不太开 卵黄干扰多 较清晰	较开 卵黄干扰少 清晰

2.2 中国对虾染色体形态三种情况

2.2.1 主缢痕方面 染色体主缢痕为着丝点存在部位,一般有一浅裂隙。在我们制备的染色体分裂相中,发现有一类分裂相主缢痕呈增强形态。两条染色体臂平行排列,姊妹染色体紧紧靠在一起,主缢痕裂隙很大,小的染色体其裂隙可达染色体的1/3(见图版5)。这种分裂相特征很明显,和其他分裂相极易区别。

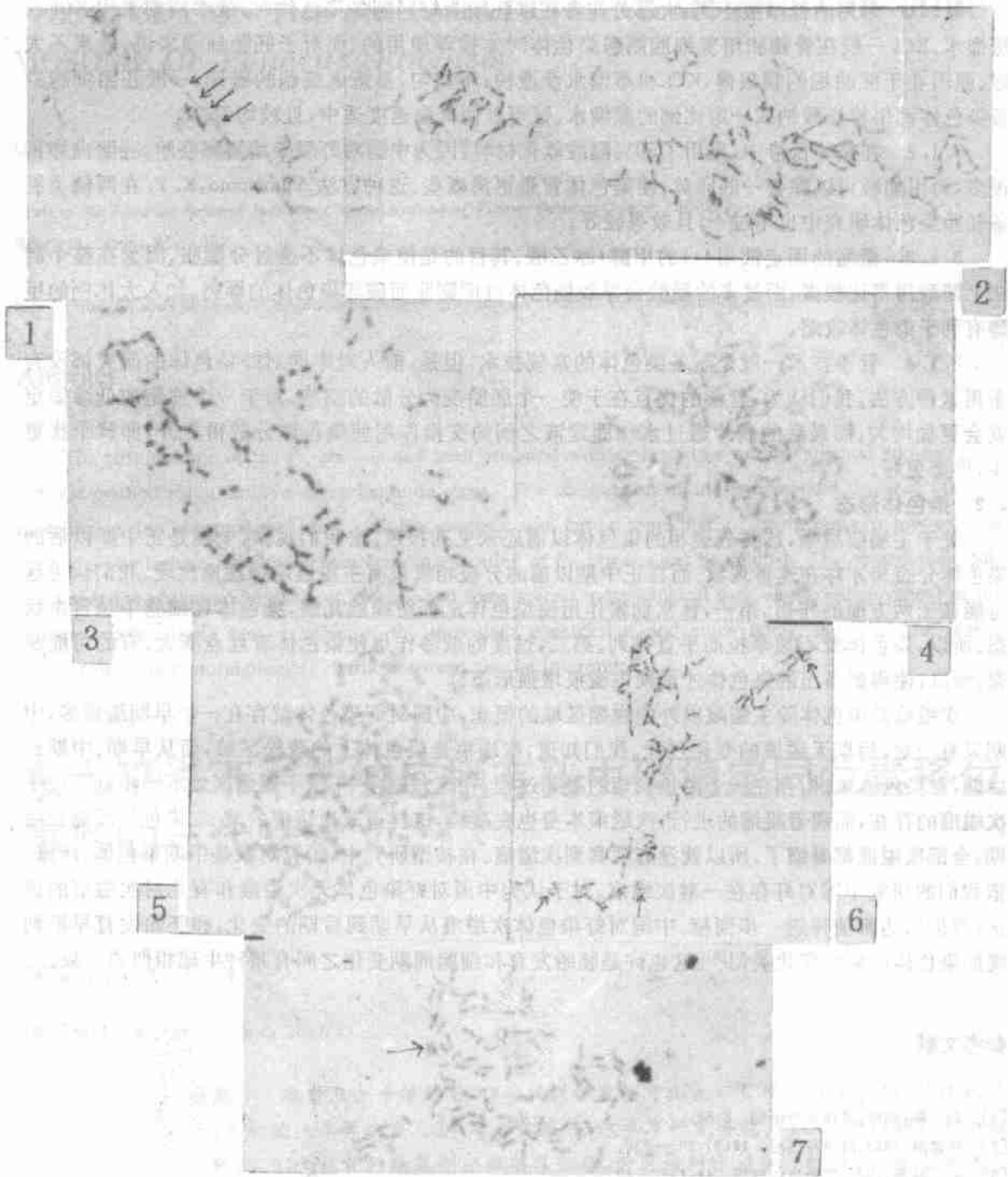
2.2.2 次缢痕方面 次缢痕是除主缢痕以外的染色体缢缩区。通过观察发现,中国对虾染色体上的次缢痕数目不是恒定的。即存在一个从早中期多,到正中期少,到后期没有的变化(见图版1,2,3)。在早中期或晚前期,染色体呈节段状分布,一条染色体上有多个缢痕。随着有丝分裂的进行,染色体从早中期向正中期行进,染色体不断缩短,次缢痕数目也在不断减少。到正中期一般稳定在一对(见图版2)。随着染色体向后后期运动,染色体凝缩的进行,原来的一对次缢痕也不存在了(见图版3)。因一般核型分析是依正中期染色体为准,所以,我们认为中国对虾染色体有一对次缢痕。但是,我们还发现一个奇怪的现象,中国对虾染色体虽然收缩到正中期了,但次缢痕还有很多。不但如此,而且这些次缢痕大部分存在于染色体分裂相只有1对次缢痕,这种多次缢痕的反常现象可能是和这个发育时期中国对虾染色体脆性部位的高表达有关。

2.2.3 同源配对 我们知道,同源染色体配对是减数分裂前期染色体的行为,一般有丝分裂没有这一现象。但是,在我们制备中国对虾染色体标本时,发现有的分裂相的一部分染色体有同源配对现象。这一现象的原因还不知道,有待今后进一步研究(见图版7)。

3 讨论

3.1 染色体的制备

中国对虾染色体制备方法有许多,如:压片法;火焰干燥法;压碎法等等。但总的来讲,从结果上看,却不够十分理想。究其原因,首先这和取材有关。对于成体对虾来讲,其身体各部分发育较完善。分生组织较少,很难获得大量的分裂相,所以也就很难制备出染色体标本。另外,对虾属开管式循环的低等无脊椎动物,体内代谢活动受环境影响较大。这就更不易找到分裂旺盛的组织。这本身就给制备染色体造成困难。也正是上述原因,许多报道^[1~3]都采用生殖腺和胚胎、幼体为材料,获得了较好的效果。但是,用生殖腺存在的一个问题就是减数分裂和有丝分裂不同。秋水仙素和低渗作用对



图版说明

图版1 早中期染色体分裂相,箭头示染色体多个次缢痕。图版2 管渗法制备的正中期染色体,箭头示中国对虾唯一一对次缢痕。
图版3 后中期染色体分裂相,示染色体无次缢痕存在。图版4 整体低渗法制备的染色体分裂相。图版5 主缢痕增强现象的分裂相。图版6 中期染色体多次缢痕现象,箭头示染色体端部次缢痕。图版7 同源配对现象。

染色体的缩短和分散不起重要作用,因此,染色体形态和分散程度远没有胚胎为材料的效果好。其次,染色体制备的好坏和操作过程有关。我们采用的这两种操作方法,在以下方面做了改进:

3.1.1 采用的低渗液不同,大部分作者在以胚胎为材料制备染色体时,低渗液都采用 KCl 或蒸馏水。KCl 一般在骨髓和培养细胞制备染色体时才推荐使用的。而对于胚胎细胞来讲,效果不太好。原因在于胚胎细胞膜很薄,KCl 和蒸馏水渗透快、不均匀,易造成细胞的破碎。一般胚胎细胞制备染色体都用柠檬酸钠或一定比例的蒸馏水。这可以使低渗速度适中,且较均匀。

3.1.2 在整体低渗中,采用了50%醋酸软化材料。因为中国对虾属于均黄卵胚胎,胚胎内卵黄很多,而用醋酸可以除去一些卵黄,使染色体背景更清晰些。这种方法 Yamamoto, K. Y. 在两栖类制备胚胎染色体研究中也用过^[4],且效果较好。

3.1.3 最后的固定液用4:1的甲醇:冰乙酸。其目的是使染色体不会过分膨胀。因为在整个制法上醋酸用得比较多,而过多的醋酸会导致染色体过度膨胀而破坏染色体的形态。加入大比例的甲醇有利于染色体收缩。

3.1.4 管渗技术一般是制备染色体的常规技术,但是,前人对中国对虾染色体的研究都没有采用这种方法。我们认为,管渗的优点在于使一个胚胎变为分散的细胞。对于一个细胞的低渗固定就会更加均匀。而最后的滴片通过水和固定液之间的交换作用使染色体分散得更开,卵黄干扰更少,形态更好。

3.2 染色体形态

关于主缢痕增强,这类分裂相的染色体以前还未见到报道。按我们观察,一般是正中期以后的染色体分裂相才存在这种现象。而在正中期以前的分裂相就没有主缢痕增强现象出现。我们认为这可能在于两方面的作用。第一,秋水仙素作用使染色体全部纺锤丝瓦解,染色体在细胞中呈自由状态。所以,染色体臂不被牵拉而平直排列。第二,过度的低渗作用使染色体着丝点膨大,有的可能断裂。所以,使得制备出的染色体才呈现主缢痕增强形态。

次缢痕是染色体除主缢痕以外的缢缩区域的概念,中国对虾染色体就存在一个早期缢痕多,中期只有一对,后期无缢痕的变化过程。我们知道,次缢痕是染色体上的疏松区域,而从早期、中期到后期,对染色体来讲,存在一个由长到短的凝缩过程。在这一过程中,由于凝缩区域不同步就造成了次缢痕的存在,而随着凝缩的进行,次缢痕本身也在凝缩,这样造成次缢痕的减少。染色体凝缩到后期,全部次缢痕都凝缩了,所以就没有观察到次缢痕。在核型研究中,研究对象是中期染色体,所以,依我们的研究中国对虾存在一对次缢痕。对于认为中国对虾染色体无次缢痕和有几对次缢痕的说法,我们认为都值得进一步商榷。中国对虾染色体次缢痕从早期到后期的变化,和胚胎发育早期到晚期染色体次缢痕变化类似^[5]。这也许是胚胎发育和细胞周期变化之间有某种生理相似的结果。

参考文献

- [1] 刘 萍,1987.海洋水产研究 8:88.
- [2] 相建海,1988.海洋与湖沼 19(3):205~230.
- [3] 宋 崢等,1985.实验生物学报 18(1):77~82.
- [4] Dai Jixun et al., 1989. *J. of Ocean Univer. of Qingdao* 19(4)(1):97-103.
- [5] Yamamoto, K. Y. et al., 1980. *Develop. Growth and Differ* 22(2):79-92.

THE STUDY ON THE PREPARATION AND MORPHEA OF CHROMOSOME OF *Penaeus chinensis*

Liu Ping, Mai Ming, Kong Jie, Wang Qingyin and Yang Conghai

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences Qingdao 266071)

Received: June, 21, 1992

Key Words: *Penaeus chinensis*, Chromosome embryo low-osmosis method, Cell low-osmosis method

Abstract

The chromosome of the *P. chinensis* had been prepared with embryo low-osmosis method and cell low-osmosis method using embryo of archenteron stage. The comparison of the two methods declared that the morphology of the chromosome using cell low-osmosis was better than that of using embryo low-osmosis method. The technique of the chromosome preparation of *P. chinensis* had been studied. The observation indicated that the chromosome of the *P. chinensis* had some special morphological characters such as the enhancement of the primary constriction, the variation of the secondary constriction and autosyndetic pairing. The reasons which cause these morphological characters were also interpreted.