

# 热休克诱导斑马鱼异源三倍体的研究\*

吴玉萍 叶玉珍<sup>†</sup> 吴清江<sup>†</sup>

(珠海市妇幼保健院遗传研究所 珠海 519000)

<sup>†</sup>(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

**提要** 于 1997 年 5 月在广东省珠海市采集斑马鱼和豹纹斑马鱼, 采用热休克方法研究阻止第二极体排放诱导异源三倍体斑马鱼的适宜条件。按正交实验方案组合诱导参数, 结果表明: 在卵受精后 2min, 采用 39℃ 持续处理 2min, 三倍化率可达 53.8%, 原肠期相对存活率为 91.0%, 尾芽期相对存活率为 91%, 孵化期相对存活率为 91.1%。本研究分析了热休克处理的参数与三倍体出现率和胚胎相对存活率的关系, 并得出诱导参数中起始休克时间为重要因素, 其次为持续时间和休克温度。本研究为构建人工三倍体模型奠定了基础, 并对三倍体的应用前景进行了讨论。

**关键词** 基因组操作 异源三倍体 斑马鱼 正交实验

**学科分类号** Q953

鱼类染色体组操作是遗传育种工作的重点研究领域之一。鱼类人工三倍体培育对控制过度繁殖、增加生长速率以及延长成熟鱼的寿命等都可能是有效的; 鱼类天然三倍体的存在所带来的理论意义以及人工三倍体“可育性”的争议一直是遗传育种学者关注的焦点(楼允东, 1984; Purdom, 1983; 桂建芳等, 1990; Wu *et al.*, 1986), 吴清江等(1997a)发现人工诱导的复合三倍体鲤鱼的雌性不仅卵细胞可以发育成熟而且有天然雌核发育形成克隆的特性。在这种背景下, 作者拟定以脊椎动物模式物种——斑马鱼为实验材料, 优化各项诱导参数, 建立人工三倍体模型, 为进一步探讨三倍体的生长发育潜能以及在分子水平上寻找“可育性”的决定机制积累资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 亲鱼来源

斑马鱼(*Brachydanio rerio*)和豹纹斑马鱼(*Brachydanio frankei*), 于 1997 年 5 月购自珠海市拱北市场。

### 1.2 三倍体诱导

实验用亲本组合为 *B. rerio* (♂) × *B. frankei* (♀)。休克实验组合按  $L_9(3^3)$  正交表进行正交实验设计。

### 1.3 倍性鉴定

原肠期采取混合胚胎制片和单个胚胎制片(洪云汉, 1987), 幼鱼倍性检测采用再生尾

\* 国家自然科学基金重点资助项目, 39823003 号。吴玉萍, 女, 出生于 1963 年 11 月, 博士, E-mail: zhwy@163.net

收稿日期: 1998-09-30, 收修改稿日期: 1999-05-04

鳍组织制片。

#### 1.4 存活率计算

在囊胚期、原肠期、尾芽期、孵化期统计各个实验组和对照组的样品数,以对照组发育至囊胚期的胚胎占卵数的比例作为受精率,分别折算出实验组和对照组在胚胎发育中的存活率,再将各个发育阶段实验组的存活率除以对照组的存活率以求得各发育阶段的存活率。

#### 1.5 三倍化率计算

在确定倍性时,一般染色体数为 50 左右的为二倍体,75 左右的为三倍体,25 左右的为单倍体,明显少于 50 的为次二倍体,明显多于 50 少于 75 的为次三倍体,既有 50 左右又有 75 左右的为镶嵌体。对于混合胚胎制片,每项实验组合观察 100 个分裂相;对于单个胚胎或幼鱼,一般计数至少 10 个分裂相。三倍化率为三倍体、次三倍体的分裂相或胚胎数占检测总分裂相数或总胚胎数的百分比(桂建芳等,1990)。

## 2 结果

### 2.1 三倍体正交实验

根据受精后不同起始时间进行休克处理的各项参数得出了胚胎三倍化诱导率并统计了胚胎发育至原肠期、尾芽期、孵化期相对于对照组的存活率,另外还进行了 D、E、I 三组实验,结果见表 1。由表 1 可知,本实验诱导三倍化率可达 53.8% 以上,综合评分高的三项组合为: F 组:受精后 2min, 39℃ 持续 2min; J 组:受精后 3min, 39℃ 持续处理 3min; L 组:受精后 3min, 41℃ 持续处理 2min。但是 J 组三倍化率低(28%),显然不是优化条件,而 L 组休克温度高,经染色体制片观察发现次二倍体和次三倍体较多,因而也不能考虑

表 1 温度休克诱导斑马鱼三倍体实验结果

Tab. 1 Experimental result of induction of triploid in zebrafish by thermal shock

实验组编号	起始休克时间(min)	休克温度(℃)	持续时间(min)	原肠期相对存活率(%)	尾芽期相对存活率(%)	孵化期相对存活率(%)	倍性鉴定样品	次二倍体发生率(%)	次三倍体发生率(%)	三倍化率(%)	综合评分
A	1	39	1	75.9	34.9	31.9	鱼苗	0	0	11.8	23.9
B	1	40	2	91.8	65.9	65.9	胚胎	5.1	5	12.5	44.5
C	1	41	3	96.4	30.4	28.8	胚胎	6.2	0	21.9	26.0
D	1	41	1	60	NA	NA	胚胎	4.8	3	34.4	NA
E	1.5	1	30	70	63	NA	胚胎	6.8	4.8	32.1	NA
F	2	39	2	91	91	90.1	胚胎	4.4	1.6	53.8	75.6
G	2	40	3	NA	65.8	63.8	胚胎	5.2	1.7	48.7	57.8
H	2	41	1	54	NA	53.5	胚胎	10	4.7	26.7	42.8
I	2	41	2	82.9	82.9	82.9	胚胎	8	5.8	42.0	66.5
J	3	39	3	100	100	100	胚胎	13	10	28.0	71.2
K	3	40	1	50	NA	49.5	胚胎	25	6.5	32.2	42.6
L	3	41	2	91.8	91.8	90.7	胚胎	19	5.5	53.2	75.7

注:综合评分=三倍化率×40%+孵化期相对性存活率×60%;NA:未统计

采用。F 组的三倍化率和胚胎存活率都比较高, 此组各项诱导参数比较理想。对表 1 进行数据分析, 总结于表 2。在表 2 中, 极差大的因素是重要因素, 因此对综合评分、三倍化率、孵化期相对存活率三者而言, 起始休克时间均是重要因素, 次之为持续时间、休克温度。结果表明: 起始休克时间为受精后 2min、休克温度为 39℃、持续时间为 2min 的条件下, 胚胎三倍化率和各时期相对存活率比较高。

表 2 温度休克诱导斑马鱼三倍体实验的结果分析

Tab. 2 Statistic analysis for result of induction of triploid in zebrafish by the thermal shock

项目	综合评分			三倍化率			孵化期相对存活率		
	起始时间	休克温度	持续时间	起始时间	休克温度	持续时间	起始时间	休克温度	持续时间
K 1	94.4	170.6	109.2	60.5	93.6	78.8	126.2	222	134.9
K 2	182.0	144.9	196.7	128.4	93.4	121.1	217.7	179.2	247.0
K 3	189.5	158.3	154.8	113.4	106.9	98.6	240.2	191.9	192.6
极差	95.1	25.7	87.5	67.9	13.5	42.3	114	42.8	112.1

注: K 值为不同水平上三倍体诱导结果对各处理参数的积和; 极差= 最大值- 最小值; 时间单位为 min; 温度单位为℃

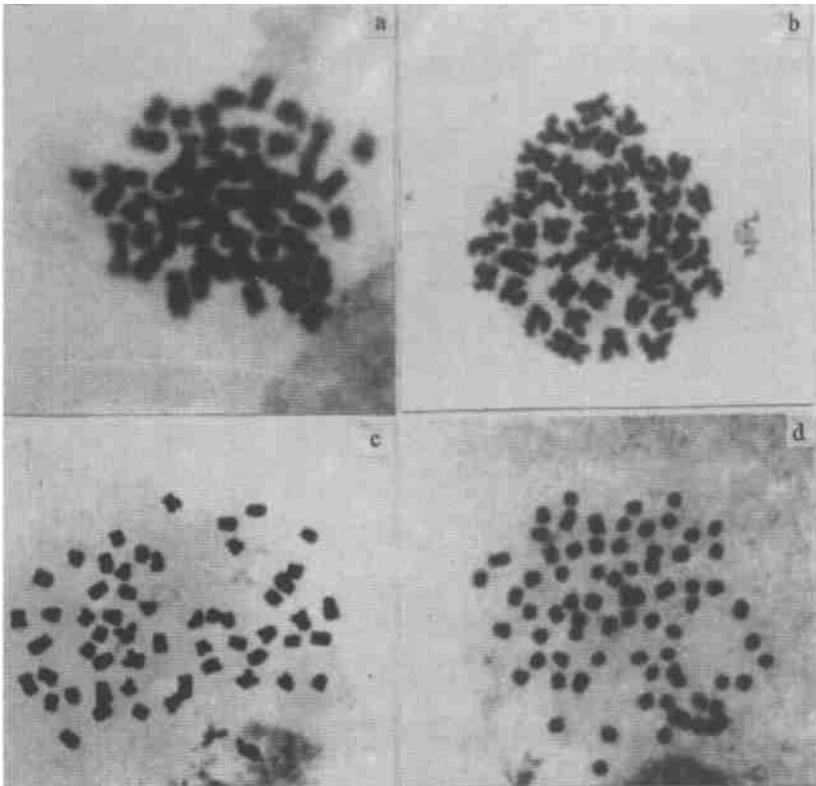


图 1 人工三倍体斑马鱼胚胎细胞中期分裂相

Fig. 1 Metaphases of artificial triploid zebrafish embryo

a. 斑马鱼二倍体胚胎中期分裂相 ( $2n=50$ ); b. 豹纹斑马鱼二倍体胚胎中期分裂相

( $2n=50$ ); c. 非整倍体中期分裂相(染色体数为 55); d. 三倍体胚胎中期分裂相( $3n=75$ )

## 2.2 染色体数目

斑马鱼和豹纹斑马鱼二倍体染色体数均为:  $2n = 50$  (图 1a、b); 三倍体染色体数为:  $3n = 75$  (图 1d), 热休克中曾出现非整倍体(图 1c)。

## 3 讨论

### 3.1 温度休克阻止第二极体排放的最佳时期

不同鱼类第二极体的排放时间是不同的, 一般冷水性鱼类较迟, 如鲑科鱼类大多在受精后 15—40min (Lou, 1984)。温水性鱼类较早, 如水晶彩鲫在受精后 4—5min 开始处理最好(桂建芳等, 1990)。鲤鱼在受精后 1—9min (Recoubratsky *et al.*, 1992; Gervai *et al.*, 1980; Wu *et al.*, 1986) 处理效果最好, 总之, 应依据卵子成熟状态、鱼类生长习性以及所处生长环境来确定。卵受精后, 从第二次成熟分裂中期到第二极体排出这段时间, 有丝分裂进程分为中期、后期、末期, 分别对应于卵子启动期、休克敏感期、休克不应期(桂建芳等, 1995)。本研究证实, 斑马鱼受精后 1min 为卵子启动期, 此时若进行休克处理, 受精卵不能完成激动和修整, 阻断了第二次成熟分裂, 所以三倍化率和胚胎相对成活率较低; 而受精后 2—3min, 为休克敏感期, 此时若采取适当的温度处理(39℃)就能使微管蛋白解聚, 纺锤体消失, 因此可获得较高的三倍化率, 但如果处理的温度过高(如 41℃), 则会使染色体断裂或丢失, 形成非整倍体, 胚胎受到损害; 待受精 3min 以后为休克不应期, 此时受精卵即将排出第二极体, 由于受精卵发育速度不均一, 仍会观察到少数三倍化胚胎, 但此时经温度休克处理, 排出的极体不是一个完整的染色体组, 胚胎将形成次二倍体或次三倍体。作者发现 J、K、L(表 1) 三个实验组合, 均为受精后 3min 开始处理, 胚胎的非整倍体多, 存在较多次二倍体和次三倍体。

### 3.2 休克温度和持续处理时间的最佳条件

受精后用仅低于致死温度的热休克可以诱导三倍体, 用较低的温度较长时间的处理可以对卵提供较大的均匀性(楼允东, 1984)。一般认为鲑科鱼类较长, 而鲤科鱼类一般在 2—3min 为好(Chourout, 1982)。本研究得出斑马鱼 *B. frankei* (♀) × *B. rerio* (♂) 三倍化诱导适宜条件为: 卵受精后 2min, 39℃持续 2min, 这与 Kavumpurath 等(1992)在诱导斑马鱼雌核发育时所得到的抑制第二极体排放的条件相近, 他们认为 *B. frankei* (♀) 与经紫外线灭活的 *B. rerio* (♂) 精子受精后 2.5min, 经 39℃休克处理 3min, 57% 胚胎可以正常孵化。Streisinger 等(1981)指出建立鱼类纯系采用温度休克比水压力更有效, 温度处理的 10%—20% 受精卵能够发育、生长到成鱼, 休克处理的最佳温度和效率取决于母本基因型。

### 3.3 意义及前景

早在 1979 年, 吴清江等就提出通过人工诱导杂种三倍体, 并用雌核发育的方式繁育后代, 以防止杂交后代分离, 从而达到杂种优势多代利用。随着对人工诱导三倍体的深入研究, 这种设想已成为现实(吴清江等, 1997a), 而且为促进转基因技术的应用又开辟了一条行之有效的途径(Thorgaard *et al.*, 1992)。此举为生物技术应用于遗传育种提供了安全保障。

三倍体与单性生殖存在某些必然的联系, 即由于三倍体而导致单性生殖, 另一方面, 单性生殖亦可能为保留天然三倍体提供了一种手段。一般来说, 三倍体是不能通过有性

生殖而繁衍的,但也有例外。Kobayasi(1981)发现在三倍体种群中存在有行雌核发育的四倍体个体;桂建芳等(1992)证明人工繁育的三倍体异育银鲫少数卵子不但具有雌核发育保持自身全部染色体的能力,而且还有融合外源精子,将精子的染色体并入协同发育的能力即少数卵子兼有雌核发育和两性融合的功能。因此鱼类生殖方式的进化过程可归纳为:杂交 $\rightarrow$ 二倍体单性生殖,卵母细胞发育过程中缺少第一次成熟分裂,成熟雌核具有两套完整染色体组(如:*Poeciliopsis monacha-lucida*, 鲤鲫杂种) $\rightarrow$ 再杂交 $\rightarrow$ 三倍体单性生殖(如:*P. 2 monacha-lucida*, *P. monacha-2 lucida*, 人工复合三倍体鲤) $\rightarrow$ 少数雌性的卵细胞可再杂交 $\rightarrow$ 四倍体单性生殖。

培育三倍体鱼类,可以有效地控制过度繁殖、延长成熟鱼的寿命、促进生长。研究发现,三倍体成鱼比二倍体生长快,其原因可能是在二倍体中用于促进性腺发育的能量及物质,在三倍体中则被用来生长。另外,利用人工诱导三倍体,可提高远缘杂交后代的存活率。在鱼类远缘杂交中,诱导人工三倍体,增加一套母本基因剂量,使得基因产物的量与母本二倍体相当,这种基因剂量补偿效应不仅避免了“双单倍体综合征”带来的一系列发育异常现象,而且还可排除父本基因的干扰,缓解父母本基因不亲和所造成的胚胎发育受阻现象(吴清江等,1997b)。

## 参 考 文 献

- 吴清江,柯鸿文,陈荣德等,1979. 鲤鱼杂种优势多代利用的探讨. 水生生物学集刊,6(4):445-449
- 吴清江,叶玉珍,陈荣德,1997a. 具有天然雌核发育特性的人工复合三倍体鲤鱼. 自然科学进展,7(3):340-344
- 吴清江,付洪拓,叶玉珍,1997b. 酶的基因剂量效应及其对鱼类远缘杂交的影响. 水生生物学报,21(2):143-151
- 洪云汉,1987. 鱼类单个胚胎染色体标本的快速制备法. 淡水渔业,1:35-36
- 桂建芳,梁绍昌,孙建民等,1990. 鱼类染色体组操作的研究 I: 静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫. 水生生物学报,14(4):336-343
- 桂建芳,梁绍昌,朱蓝菲等,1992. 异育银鲫人工繁育群体中复合四倍体的发现及其育种潜力. 科学通报,37(7):646-648
- 桂建芳,肖武汉,梁绍昌等,1995. 静水压休克诱导水晶彩鲫三倍体和四倍体的细胞学机理初探. 水生生物学报,19(1):49-45
- 楼允东,1984. 国外对鱼类多倍体育种的研究. 水产学报,8(4):343-356
- Chourrout D, 1982. Tetraploidy induced by heat shocks in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Reprod Nutr Develop, 22(3):569-574
- Gervai J, Peter S, Nagy A *et al*, 1980. Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio* L. J Fish Biol, 17(6):667-671
- Kavumpurath S, Pandian T J, 1992. Hybridization and gynogenesis in two species of the genus *Brachydanio*. Aquaculture, 105:107-116
- Kobayasi H, 1981. Origin of the polyploid funa (3). Zool Mag, 90(4):619
- Lou Y D, 1984. Diploid gynogenesis induced by hydrostatic pressure in rainbow trout *Salmo gairdnerii* Richardson. J Fish Biol, 24(6):665-670
- Purdum C E, 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. Aquaculture, 33:287-300
- Recoubatsky A V, Gomelsky B I, Emelyanova O V *et al*, 1992. Triploid common carp produced by heat shock with industrial fish-farm technology. Aquaculture, 108:13-19
- Streisinger G, Walker C H, Dover W *et al*, 1981. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). Nature, 291:293-296
- Thorgaard G H, Scheerer P D, Zhang J, 1992. Integration of chromosome set manipulation and transgenic technologies

for fishes. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1(4/5): 251—256

Wu C, Ye Y, Chen R, 1986. Genome manipulation in carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 54: 57—61

## STUDIES ON THE INDUCTION OF ALLOTRIPLOID USING HEAT SHOCK IN ZEBRAFISH, *BRACHYDANIO* *FRANKEI* AND *BRACHYDANIO RERIO*

WU Yu-ping, YE Yu-zhen, WU Qing-jiang

(*Institute of Genetics, Maternal and Child Health Hospital of Zhuhai, Zhuhai, 519000*)

(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072*)

**Abstract** *Brachydanio frankei* and *Brachydanio rerio* were collected from the coastal waters of Zhuhai, Guangdong Province in May 1997. Temperature treatment method is utilized to study induction of allotriploid zebrafish. The present research elaborates an appropriate condition for production of allotriploid zebrafish by using heat shock with the retention of the second polar body. From the orthogonal composite design of  $L_9(3^3)$ , an effective procedure for inducing triploid is the treatment of eggs at 39°C, 2 min after insemination for 2 min duration, which results in 53.8% triploidy embryos, 91.0%, 91.0% and 90.1% relative survival at gastrula stage, tail bud stage and hatching stage, respectively. The interrelationship between the percentage of triploid and survival with different inducing parameters are analyzed. It leads to conclusions that the most important factor for triploidy induction is initiative time of shock, the second is duration time and the third is shock temperature.

**Key words** Genome manipulation Allotriploid Zebrafish Orthogonal test

**Subject classification number** Q953