

文章编号: 1000- 0615(2003)05- 0425- 06

三倍体皱纹盘鲍活体倍性检测

李雅娟, 李霞, 丁君, 毛连菊, 王子臣, 常亚青, 宋坚, 魏杰
(大连水产学院农业部海洋水产增养殖学与生物技术重点开放实验室, 辽宁大连 116023)

摘要:以皱纹盘鲍的血细胞为材料,采用植物血球凝集素(PHA)体外浸泡法,运用正交实验设计,探讨 PHA 处理时间、PHA 浓度、抽血时间对细胞分裂频度的影响。根据正交实验直观分析结果,得出用血细胞直接制备染色体标本进行三倍体皱纹盘鲍活体倍性检测的最优组合:PHA 处理时间 18h、PHA 浓度 0.04%,抽血时间 22:00-24:00,3 因素的主次顺序:PHA 处理时间 \rightarrow PHA 浓度 \rightarrow 抽血时间。并可获得大量图象清晰、长度适中、分散良好的中期分裂相,是皱纹盘鲍活体倍性检测的最佳方法。同时,通过流式细胞仪测定皱纹盘鲍血细胞 DNA 相对含量进行三倍体皱纹盘鲍活体倍性检测,该方法制样简单,测试速度快。

关键词:皱纹盘鲍;血细胞;活体倍性检测;植物血球凝集素;流式细胞仪

中图分类号:Q343.2⁺44 文献标识码:A

Living ploidy detection of triploid *Haliotis discus hannai*

LI Ya-juan, LI Xia, DING Jun, MAO Lian-ju, WANG Zi-chen, CHANG Ya-qing, SONG Jian, WEI Jie
(Key Lab of Mariculture & Biotechnology in Aquaculture Certified by the Ministry of Agriculture,
Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: In this paper, the orthogonal experiment of three factors and three levels $L_9(3^4)$ was adopted using blood corpuscle of *Haliotis discus hannai* which were *in vitro* immersing in PHA solution. There were three factors and three levels which included PHA treatment time: 6h, 12h, 18h; PHA concentration: 0.02%, 0.04%, 0.06%; sampling time: 16:00-18:00, 22:00-24:00, 4:00-6:00, respectively. The tests were repeated two times. The results showed that the optimal combination of three factors and three levels in the detection of triploid *Haliotis discus hannai* by using chromosome specimens from blood cells of living bodies was: PHA treatment time 18h, PHA concentration 0.04% and sampling time 22:00-24:00. The order of the three factors was PHA treatment time \rightarrow PHA concentration \rightarrow sampling time. Under the optimal combination of the three factors and three levels many clear, proper length and well scattered metaphase chromosomes could be obtained. It is the best method of detecting the ploidy of living *Haliotis discus hannai*. Determining the relatively content of blood corpuscles' DNA with flow cytometry could also make ploidy detection. But the device was expensive and the method was difficult to be spread.

Key words: *Haliotis discus hannai*; blood cell; living ploidy detection; PHA; flow cytometry

收稿日期: 2002-09-24

资助项目: 国家 863 高技术项目(863-819-01-04)

作者简介: 李雅娟(1961-),女,辽宁大连人,硕士,副教授,从事水产动物遗传与育种研究。Tel: 0411-4225375, E-mail: lzlyyjch@

随着贝类增殖养殖业的不断发展,运用染色体工程进行贝类三倍体育种的研究与日俱增。三倍体贝类具有生长周期短、一般不育、生长快、肉质改善、抗逆性增强等特点。在养殖上具有重要意义^[1]。倍性检测是多倍体育种中的一个重要环节,由于三倍体的珍贵性需要保持其健康存活状态,因此,活体倍性检测技术尤为重要。关于贝类活体倍性检测国内外已有报道^[2-8]。但在皱纹盘鲍活体倍性检测方面,已发表的多数用流式细胞仪测定,由于仪器昂贵,故不能普及。用上足触手、外套膜活体组织制备染色体标本,展片率不高,易造成感染而至死亡。近几年来,作者结合皱纹盘鲍多倍体诱导工作,在原来研究的基础上,以血细胞为材料,采用 PHA 体外浸泡法制备染色体标本及用流式细胞仪测定血细胞 DNA 相对含量进行三倍体活体倍性检测,探讨了制备皱纹盘鲍染色体标本的方法,为开展皱纹盘鲍多倍体育种及各项实验提供重要依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物

2 龄皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino), 体长约 3~4 cm, 系 1996 大连水产学院采用咖啡因结合热休克进行三倍体诱导处理获得的个体, 暂养温度 20℃。

1.1.2 仪 器

德国产 Partec PAS-II 流式细胞仪。

1.2 方 法

1.2.1 正交实验设计

以血细胞为材料, 选用 $L_9(3^4)$ 设计^[9], 进行三因素三水平的正交实验(表 1)。PHA 处理时间 A 设 6h、12h、18h; PHA 浓度 B 设 0.02%、0.04%、0.06%; 抽血时间 C, 设 16:00~18:00、22:00~24:00、4:00~6:00。试验平行重复两次。影响细胞分裂频度的三因素的主次顺序和最优水平组合以直观分析法获得。

1.2.2 染色体标本的制备

在无菌条件下用灭菌的注射器在供试鲍鳃基血窦(足中线距头 1/3 偏左)处取血 0.6 mL, 分别放入 0.05% 秋水仙素和不同浓度的 PHA 混合液中处理不同时间, 离心 5 min ($1000r \cdot \text{min}^{-1}$) 后收集细胞, 用 $0.075 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 低渗处理 40~60 min, 离心弃去上清液加入新配制的 Carnoy 氏固定液(甲醇:冰醋酸=3:1) 2~3 mL 固定, 重复 3 次, 每次 15 min, 放入冰箱冷冻室(-18℃)中保存 12h 以上, 离心弃去上清液加入 1~2 滴 50% 冰醋酸溶液, 使其成为细胞悬浊液, 再滴入新的 Carnoy 氏固定液 5~10 滴进行冷滴片, 风干后用 10% Giemsa 染液扣染 2h 以上, 流水冲洗, 风干, 镜检。统计分裂相数目。试验重复 2 次, 每次计数 4 张片子, 计数结果取平均值。

1.2.3 流式细胞仪测定法

抽取鲍鳃基血窦(足中线距头 1/3 偏左)的血液 0.02~0.04 mL, 注射到预先装有 0.05~0.1 mL 超滤海水的测试小管中, 加入 1.0~1.5 mL DAPI 染液, 上机进行测试, 每秒通过的细胞数维持在 100~150 个。测试结果以直方图表示。

表 1 正交实验设计

Tab. 1 The orthogonal test design

试验号 no.	PHA 处理时间(h) PHA treatment time	PHA 浓度(%) PHA concentration	抽血时间 sampling time
1	1(6)	1(0.02)	1(16:00-18:00)
2	1	2(0.04)	2(22:00-24:00)
3	1	3(0.06)	3(4:00-6:00)
4	2(12)	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3(18)	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

2 实验结果

2.1 正交实验结果

根据直观分析结果(表2)中的极差R值,影响细胞分裂频度的三因素的主次顺序为:PHA处理时间 \rightarrow PHA浓度 \rightarrow 抽血时间。为了更直观地了解细胞分裂频度与各因素水平的变化情况,作各因素水平对细胞分裂频度的效应图(图1)。

表2 正交实验结果

Tab.2 The results of orthogonal test

试验号 no.	PHA处理时间(h) PHA treatment time	PHA浓度(%) PHA concentration	抽血时间 sampling time	细胞分裂频度(10^{-4}) mitosis frequency
1	1(6)	1(0.02)	1(16:00-18:00)	4.20
2	1	2(0.04)	2(22:00-24:00)	5.01
3	1	3(0.06)	3(4:00-6:00)	3.95
4	2(12)	1	2	6.65
5	2	2	3	6.67
6	2	3	1	6.31
7	3(18)	1	3	7.09
8	3	2	1	6.92
9	3	3	2	6.18
K_1	13.16	17.94	17.43	
K_2	19.63	18.6	17.84	
K_3	20.19	17.71	17.71	
k_1	4.39	5.98	5.81	
k_2	6.54	6.2	5.95	
k_3	6.73	5.9	5.90	
R	2.34	0.3	0.14	

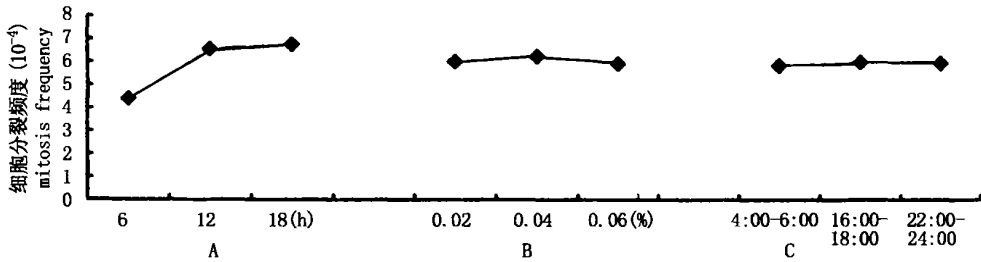


图1 三因素对细胞分裂频度的影响

Fig.1 Effect of three factors on mitosis frequency

A. PHA处理时间(h); B. PHA浓度(%); C. 抽血时间

A. PHA treatment time; B. PHA concentration(%); C. sampling time

在图1中, A、B因素直线陡度大,说明A、B因素对细胞分裂频度影响效应大,即A、B是主要因素, C因素为次要因素。得到的最优水平组合为:PHA处理时间18h、PHA浓度0.04%、抽血时间22:00-24:00。染色体制片可获得图像清晰、分散良好、长度适中的染色体中期分裂图像,二倍体个体染色体数 $2n=36$ (图2),三倍体个体染色体数 $3n=54$ (图3)。

2.2 流式细胞仪检测结果

检测结果以DNA直方图的形式表示(图4),图中横坐标代表DNA的相对含量,纵坐标代表细胞频率。每个样品至少测定 10×10^4 个细胞,重复2次。获得了较好的峰值图谱,二倍体个体血细胞的DNA

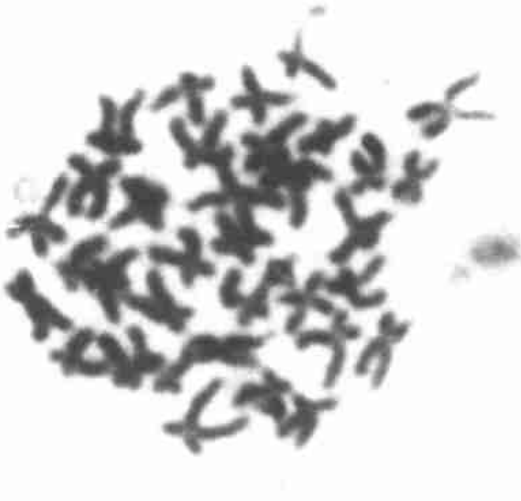


图2 二倍体中期分裂相(2n= 36)

Fig. 2 The metaphase of diploid



图3 三倍体中期分裂相(3n= 54)

Fig. 3 The metaphase of triploid

相对含量有2个峰,其中一个DNA相对含量较低,细胞频率较高的是G₁期的细胞;另一个DNA相对含量较高,细胞频率较低的是G₂/M期的细胞。三倍体个体血细胞DNA的相对含量也有2个峰,其中一个DNA相对含量较低,细胞分裂频率高的是有丝分裂中G₁期的细胞,另一个DNA相对含量较高,细胞分裂频率低的是有丝分裂中G₂/M期的细胞。从图中可看出,三倍体血细胞的DNA相对含量是二倍体的1.5倍。

3 讨论

3.1 关于用血细胞直接制备染色体标本

多倍体倍性检测是多倍体育种的重要环节。目

前,鲍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^[1]。染色体计数法是倍性检测最准确、最可靠的方法。用低渗处理、空气干燥法制备鱼类染色体标本,国内外已有若干报道。但在皱纹盘鲍方面,国内已发表的有关染色体研究,孙振兴用担轮幼虫为材料滴片鉴定^[10],这种方法可以作为早期鉴定。关于成体鲍倍性检测,孙振兴、王桂云等以及Arai等用成体鲍的鳃组织通过切碎法制备染色体^[10-12],但必须将鲍处死。在多倍体育种中,由于三倍体的珍贵性需要保持其健康存活状态。因此,活体倍性检测尤为重要。在鲍活体倍性检测方面国内外很少报道,用上足触手、外套膜活体组织制备染色体,展片率不高,由于创伤面大易造成感染导致鲍死亡^[7,8]。关于用皱纹盘鲍的血细胞直接制备染色体标本进行活体倍性检测目前尚未见报道。

鲍是软体动物门腹足纲动物,为开放式循环,血液经心脏、动脉最终进入血窦,鳃基血窦是循环系统中最大的一个血窦,此处血量丰富,且处在肌肉中,取血容易,而且,在此处抽血量不超过0.4mL对鲍的生长发育没有影响。对于鲍血细胞的形态目前只有一些初步的了解,如李太武等^[13]将皱纹盘鲍血细胞分为3种:第1种细胞大,圆球形,核较小,细胞质中颗粒多;第2种细胞较大,卵圆形,核较大,细胞质中颗粒少;第3种细胞较小,圆形,细胞核圆形,染色深,胞质少,较透明。我们在实验中也观察到3种血细

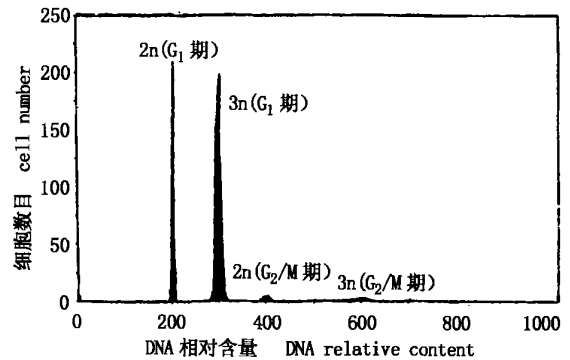


图4 皱纹盘鲍二倍体和三倍体血细胞的DNA相对含量

Fig. 4 DNA relative content of diploid and triploid blood cell in *Haliotis discus hannai*

胞,其中细胞较小,染色深的没有看到分裂相,其余 2 种血细胞都能看到分裂相。同时发现鲍的血细胞再生能力很强,1 枚鲍隔 1 天就可以再抽血 1 次。这说明血细胞的分裂速度比其他组织的细胞快,细胞分裂周期短。

制备并获得清晰的染色体分裂相,是确定染色体数目、进行多倍体倍性检测的重要环节。用皱纹盘鲍的血细胞直接制备染色体标本与用活体组织相比具有展片率高、不易感染、制备过程简单等特点。贾志良等研究认为以鳃为材料制备染色体标本,其分裂相中至少有一部分是来自血细胞的^[14]。作者在以上足触手和外套膜为材料制备染色体标本时也发现有血细胞,这说明直接用血细胞制备染色体标本是活体倍性检测的最好材料。

3.2 流式细胞仪测定法

流式细胞术是对单个细胞或细胞器快速测量 DNA 含量的高新技术。关于利用细胞核 DNA 含量的高低来检测倍性的研究已在鱼类^[15]、对虾^[16]和贝类^[17-19]有过报道。流式细胞仪检测倍性水平的基本原理是用 DNA-RNA 特异性荧光染料(如 DAPI)对细胞进行染色,在流式细胞计上用激光或紫外光激发结合在细胞核的荧光染料,检测每个细胞的荧光强度,与已知的二倍体细胞或单倍体细胞(如同种的精子)荧光强度对比,判断被检查细胞群体的倍性组成。与二倍体相比,三倍体染色体数目增加了 0.5 倍,与此相应,三倍体细胞核 DNA 含量也应是二倍体的 1.5 倍。本实验采用成鲍的血细胞通过细胞流式仪测定 DNA 相对含量进行倍性检测。该方法制样简单,测试速度快,一个样只需几秒时间,如果用标准粒子进行校准,还可知到所测样品中 DNA 的绝对含量。但仪器很昂贵,一般单位不具备该条件,顾不能普及。

3.3 植物血球凝集素

植物血球凝集素已在染色体研究的许多血培养中得到广泛应用。它能够促进动物血细胞分裂^[14],但在海产贝类的染色体研究中应用较少。王金星等^[20]借鉴鱼类染色体研究中常用的 PHA 活体注射法,在缢蛏中获得了较好的结果,经 PHA 处理的鳃细胞分裂相明显多于未经处理组。贾志良等^[14]取鳃放入含 PHA 的 MEM 培养基中培养,发现不同时间制片的鳃细胞分裂相比比例比对照组提高 6.8 倍。在本实验中,采用 PHA 体外浸泡法,探讨了不同浓度的 PHA 及不同处理时间对血细胞分裂频度的影响。根据正交实验直观分析结果,得出用血细胞直接制备染色体标本进行三倍体皱纹盘鲍活体倍性检测的最优组合:PHA 处理时间 18h、PHA 浓度 0.04%,抽血时间 22:00-24:00,3 因素的主次顺序:PHA 处理时间 \rightarrow PHA 浓度 \rightarrow 抽血时间。从上述结果可以看出,PHA 体外浸泡能提高血细胞分裂频度,而且方法简便,易于操作,避免体内注射药物残留及体外培养的麻烦。这对生长较慢的鲍来说提高细胞分裂频度对制备染色体标本具有重要意义,也为其他类似生物的染色体标本制备工作提供了一条线索。

总之,在皱纹盘鲍活体倍性检测中,以血细胞为材料,采用 PHA 体外浸泡制备染色体标本可获得大量的图象清晰、长度适中、分散良好的中期分裂相,是皱纹盘鲍活体倍性检测的最佳方法。

参考文献:

- [1] Li N. The applicatin of polyploid breeding to seashell culture[J]. Transactions of Ocean, 1992, 4(2): 80- 83. [李 诺. 多倍体育种在贝类养殖上的应用[J]. 海洋通报, 1992, 4(2): 80- 83.]
- [2] Jia Z L, Bao Z M, Pan J, et al. The instant detection of live triploid of Pacific oyster(*Crassostrea gigas*) [J]. Acta Oceanol Sin, 2001, 23(2): 142- 148. [贾志良, 包振民, 潘 洁, 等. 三倍体太平洋牡蛎的快速活体鉴定[J]. 海洋学报, 2001, 23(2): 142- 148.]
- [3] Allen S K Jr. Flow cytometry: assaying experimental Polyploid fish and shellfish[J]. Aquac, 1983, 33: 317- 328.
- [4] Ding J, Zhang G F, Song J, et al. Ploidy detemination of living pacific abalone *Haliotis discus hamai* Ino by flow cytometry[J]. Fisheries Science, 2000, 19(6): 14- 16. [丁 君, 张国范, 宋 坚, 等. 用流式细胞仪检测活体鲍倍性[J]. 水产科学, 2000, 19(6): 14- 16.]
- [5] Ding J, Zhang G F, Chang Y Q, et al. Detemination of shellfish ploidy by flow cytometry[J]. J Dalian Fish Univ, 2000, 15(4): 260- 263.

- [丁 君, 张国范, 常亚青, 等. 流式细胞术(FCM)在贝类倍性检测中的应用[J]. 大连水产学院学报, 2000, 15(4): 260- 263.]
- [6] Gong N, Song J, Ding J, et al. Rapid living determination of shellfish ploidy using flow cytometry[J]. Marine Sciences, 2000, 24(9): 17- 18. [巩 宁, 宋 坚, 丁 君, 等. 双壳类贝类活体倍性快速检测技术[J]. 海洋科学, 2000, 24(9): 17- 18.]
- [7] Seiichi Okumura. A biopsy method for obtaining chromosome preparation from epipodial tentacle tissue of the Pacific abalone[J]. Nippon Suisan Gakkaish, 1991, 57(12): 2337. [奥村诚一. 用上足触手制备染色体的方法[J]. 日本水产学会志, 1991, 57(12): 2337.]
- [8] Li Y J, Mao L J, Li X, et al. The detection of living triploid of *Haliotis discus hannai* Ino directly making chromosome sample of mantle and epipodium tentacle[J]. Acta Genet Sin, 2002, 29(6): 514- 518. [李雅娟, 毛连菊, 李 霞, 等. 三倍体皱纹盘鲍活体倍性鉴定—用上足触手、外套膜活体组织制备染色体标本[J]. 遗传学报, 2002, 29(6): 514- 518.]
- [9] Pan C Y, He Y H. The principle and the method of mathematical statistics[M]. Shanghai: Tongji University Publishing Company, 1993. 292- 293. [潘承毅, 何迎晖. 数理统计的原理与方法[M]. 上海: 同济大学出版社, 1993. 292- 293.]
- [10] Sun Z X. A method of making slice of observing chromosome of seashell[J]. Chinese Journal of Zoology, 1991, 26(4): 34- 35. [孙振兴. 一种观察贝类染色体的制片法[J]. 动物学杂志, 1991, 26(4): 34- 35.]
- [11] Wang G Y, Ma Q H, Wang X Z. The karyotype study of *Haliotis discus hannai* Ino[J]. Zoological Research, 1998, 9(2): 171- 174. [王桂云, 马庆惠, 王先志. 皱纹盘鲍的染色体研究[J]. 动物学研究, 1998, 9(2): 171- 174.]
- [12] Arai K, Tsubaki H, Ishitani Y, et al. Chromosomes of *Haliotis discus hannai* Ino and *H. discus* Reeve[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1982, 48(12): 1689- 1691.
- [13] Zhai Y M, Ding X Y, Li G Y. Progress on the hemocyte and humoral immunity of Mollusca[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1998, 29(5): 558- 562. [翟玉梅, 丁秀玉, 李光友. 软体动物血细胞及体液免疫研究进展[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(5): 558- 562.]
- [14] Jia Z L, Li Z Y, Bao Z M, et al. On methods of increasing the metaphase of shellfish[J]. J Ocean Univ Qingdao, 2001, 31(2): 232- 236. [贾志良, 李智盈, 包振民, 等. 增加贝类染色体分裂相的方法初探[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(2): 232- 236.]
- [15] Ye Y Z, Wu Q J. Relative DNA content measurement and ploidy analysis of artificial multiple triploid cap and its three parental forms[J]. Acta Hydrobiol Sin, 1998, 22(2): 119- 122. [叶玉珍, 吴清江. 人工复合三倍体鲤与亲本相对 DNA 含量及倍性分析[J]. 水生生物学报, 1998, 22(2): 119- 122.]
- [16] 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. [周岭华, 邓 田, 张晓君, 等. 利用流式细胞计进行对虾倍性检测的研究[J]. 海洋科学, 1999, 2: 42- 45.]
- [17] Li Y, Zheng X D, Wang Z P, et al. Comparison of cell nuclear DNA content among different tissues in Pacific oyster[J]. J Ocean Univ Qingdao, 1999, 29(3): 453- 456. [李 , 郑晓东, 王昭萍, 等. 牡蛎不同组织细胞核DNA含量比较[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(3): 453- 456.]
- [18] Hinegardner R. Cellular DNA content of the Mollusca[J]. Comp Biochem Physiol, 1974, 47A: 447- 460.
- [19] Hiroshi Ieyama. Chromosomes and nuclear DNA content of *Limpema* in Japan (Bivalvia: Mytilidae)[J]. Venus, 1996, 55(1): 65- 68.
- [20] Wang J X, Zhao X F, Zhou L H, et al. Chromosome study of *Sinonovacula constricta* (Bivalvia)[J]. Oceanol et Limnol Sin, 1998, 29(2): 191- 196. [王金星, 赵小凡, 周岭华, 等. 缢蛏的染色体研究[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(2): 192- 196.]