

# 用流式细胞仪检测大黄鱼三倍体

郑春静\* 吴雄飞 刘东海<sup>1</sup> 张 顺<sup>1</sup>

(宁波市海洋与渔业研究院, 宁波 315012; <sup>1</sup>宁波市第二医院, 宁波 315010)

**摘要** 通过对大黄鱼二倍体和三倍体的倍性分析, 建立流式细胞仪检测三倍体的方法。大黄鱼受精卵经三倍体诱导处理后, 胚胎期进行染色体滴片证实存在三倍体细胞。接着对该组胚胎进行育苗, 获得1~3 cm的鱼苗, 用流式细胞仪进行检测。以二倍体大黄鱼的肌肉组织或血液细胞DNA含量的峰值道数作为对照, 用同样的方法取样处理、上机、测定处理组样本个体细胞的DNA含量的峰值道数。如果处理组个体细胞的DNA含量的峰值道数是二倍体组的1.5±0.1倍, 则认为该个体为三倍体。实验结果经冷休克或静水压诱导处理的样本共检测182个, 三倍体检出率为12.09%, 其中有一组检出率高达55.56%。

**关键词** 大黄鱼; 三倍体; 流式细胞仪; 检测

随着1985年大黄鱼育苗成功, 1987年开始大黄鱼养殖, 至1996年实现大黄鱼养殖产业化。但由于多代近亲繁殖, 有害基因的积累和纯合, 以及养殖环境的恶化, 造成养殖大黄鱼品质下降, 病害暴发。为此各地开展了养殖大黄鱼品质改良育种、染色体操作技术研究。大黄鱼三倍体的研究开始于20世纪90年代末, 主要研究诱导方法及诱导参数。据报道, 到目前为止尚未获得三倍体成鱼。而对大黄鱼鱼苗用流式细胞仪进行三倍体检测也未见报道。

Van dilla等<sup>[1]</sup>首次用流式细胞仪测定细胞DNA相对含量, 为分析细胞周期提供了方便。用流式细胞仪对生物体细胞进行倍性检测, 使检测的可操作性增强。本文通过流式细胞仪检测经三倍体诱导的大黄鱼组织细胞, 分析研究了大黄鱼组织细胞的倍性, 建立了大黄鱼三倍体流式细胞仪检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 三倍体诱导的鱼苗

大黄鱼三倍体诱导研究2002年至2004年在宁波市象山港水产引种育种有限公司育苗场进行, 所用亲鱼选自象山港养殖的大黄鱼。采用人工授精获得受精卵。用冷休克和静水压休克方法阻止第二极体释放获得三倍体胚胎, 然后按大黄鱼常规养殖方法育苗与养殖, 获得1~3 cm长的鱼苗。

冷休克处理组的处理时刻为受精后1~8 min, 处理温度1~4 °C, 处理时间5~15 min, 按处理温度分3组。静水压休克的处理时刻为受精后1~5

min, 处理水压450~600 Kpa, 处理时间3~5 min, 按处理水压分4组。

### 1.2 倍性检测

**1.2.1 胚胎期倍性检测** 处理受精卵入池后6 h, 镜检。收集原肠初中期胚胎50~100个, 取胚胎细胞, 秋水仙碱(0.05%)预处理1 h, 低渗5 min(低渗液)。固定(固定液为甲醇:冰醋酸=3:1)30 min, 更换新鲜固定液一次, 用吉姆萨(Gemsa)染色液染色, 制片, 用尼康公司的Eclipse80i显微镜和摄像头镜检及摄像。

**1.2.2 鱼苗倍性检测** 本研究采用Coulter公司cycle TEST™ Reagent Kit试剂盒作碘化丙锭一步法染色, 通过流式细胞仪测定细胞DNA含量来鉴定倍性。

### 1.3 操作步骤

**1.3.1 血液或组织细胞悬液** (1)组织细胞提取 取每一尾鱼的活体组织约1 mm<sup>3</sup>, 放入细胞仪标准试管, 加PBS液约1 ml, 剪碎组织至肉眼看不见块状物, 再轻轻研至均浆状; 用细胞300目钢丝网过滤, 离心(1000 r/min)漂洗1~2次, 收集沉积细胞, 以备染色。血液细胞直接从鱼心脏提取: 解剖鱼体用注射器加抗凝剂从心脏抽取血液, 然后放入机用标准试管, 直接染色。(2) DNA 荧光染色 将细胞

收稿日期: 2005-10-08 接受日期: 2006-02-24

宁波市科技局科研项目资助(No.01N40111, No.2003A62014)

\* 通讯作者。Tel: 0574-87466892, E-mail: chunjingzheng@hotmail.com

仪标准试管内收集的组织细胞样本,用生理盐水离心漂洗3次。离心速率为1000 r/min,每次离心时间2 min。在收集细胞内加入Coulter公司DNA染色试剂,染色浓度为50 μg/ml,操作按试剂盒说明进行。(3)流式细胞仪测定 FACS为美国Beckman Coulter公司生产,型号Epics XL-MCL,该机激发光源为负离子激光器。测量前,用鞘液调整细胞浓度在 $1 \times 10^6$ 个/ml左右,测量时保持测量速率在200~300个/s。选正常二倍体细胞悬液为对照样品。(4)检测控制 测定前调校流式细胞仪使管道畅通,喷嘴清洁,仪器处于最佳状态,进行FLOWCHECK校正,使各通道的变异系数(CV)稳定在3%以下,DNA含量由仪器自动检出。通过控制流速保持细胞分离纯度<sup>[3]</sup>。

1.3.2 检测原理与表示方法<sup>[4,5]</sup> 以二倍体对照组细胞为参考计算二倍体和三倍体频率,细胞DNA含量以DNA指数(DNA index, DI)表示。

$DI = \text{处理组细胞 } G_{0/1} \text{ 峰值道数} / \text{对照组细胞 } G_{0/1} \text{ 峰值道数均值}$

以 $DI=1.0 \pm 0.1$ 为DNA二倍体的判断标准。如果 $DI=1.5 \pm 0.1$ ,则为三倍体。

#### 1.4 细胞周期分析

本研究所用的流式细胞仪只能分辨出处于细胞周期中的3个细胞群体,即 $G_{0/1}$ 期、S期、 $G_2/M$ 期细胞。根据流式细胞仪检出的3个期的细胞构成比,计算细胞增殖指数(proliferating index, PI)。SPF为S期细胞所占比例。

$$PI = (S + G_2/M) / (G_{0/1} + S + G_2/M) \times 100\%$$

$$SPF = S / (G_{0/1} + S + G_2/M) \times 100\%$$

## 2 结果

### 2.1 胚胎期倍性检测

经三倍体诱导的胚胎群体受精率59%~86%,孵化率31%~78%,成活率19%~31%。在其中一组

获得三倍体细胞染色体见图1。二倍体细胞染色体见图2。

### 2.2 鱼苗三倍体个体流式细胞仪检测

对二倍体对照组中不同样本细胞的DNA进行分析(表1), *t*检验结果表明不同样本细胞的 $G_{0/1}$ 峰值道数无显著差异。对三倍体处理组与二倍体对照组的DNA进行分析(表2),结果表明二者细胞DNA的 $G_{0/1}$ 峰值道数差异显著。



图1 三倍体细胞染色体(72) (100×, 500万像素)



图2 二倍体细胞染色体(48) (100×, 500万像素)

表1 二倍体对照组DNA分析( $\bar{x} \pm s$ )

	例数	$G_{0/1}$ 峰值道数	CV	SPF (%)	PI (%)
亲鱼血液	15	30.80±0.60	2.5±0.1	6.13±1.29	6.13±1.29
开口8天仔鱼	15	30.95±0.55	2.95±0.25	33.70±1.10	33.80±1.00
全长1~3 cm 鱼苗	15	27.31±0.43	2.59±0.26	68.33±8.34	62.07±8.56

表2 三倍体处理组与二倍体对照组的DNA比较( $\bar{x} \pm s$ )

	例数	$G_{0/1}$ 峰值道数	CV	SPF (%)	PI (%)
二倍体	45	28.45±1.52	2.63±0.27	56.52±17.50	48.93±24.41
三倍体	22	42.17±1.49	14.07±1.82	12.74±5.11	19.10±5.22

表3 处理组个体染色体倍性分析结果

组别	总例数	二倍体		三倍体	
		例数	%	例数	%
冷休克组 1	33	0	0	0	0
冷休克组 2	18	8	44.44	10	55.56
冷休克组 3	16	9	56.25	7	43.75
静水压休克组 1	18	18	100	0	0
静水压休克组 2	43	42	97.68	1	2.32
静水压休克组 3	31	28	90.32	3	9.68
静水压休克组 4	23	22	95.65	1	4.35

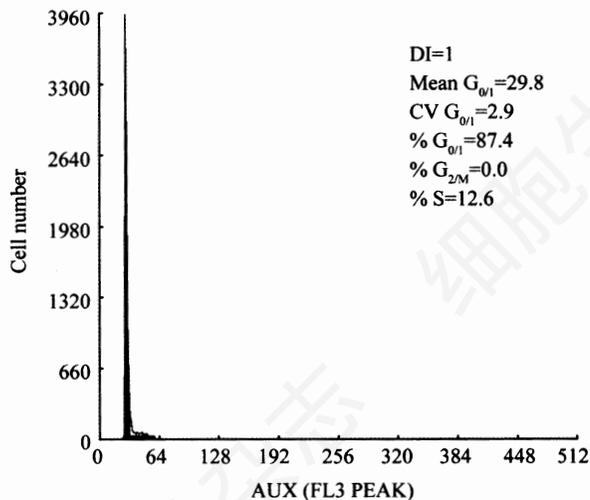


图3 大黄鱼二倍体鱼苗细胞 DNA 荧光分布直方图

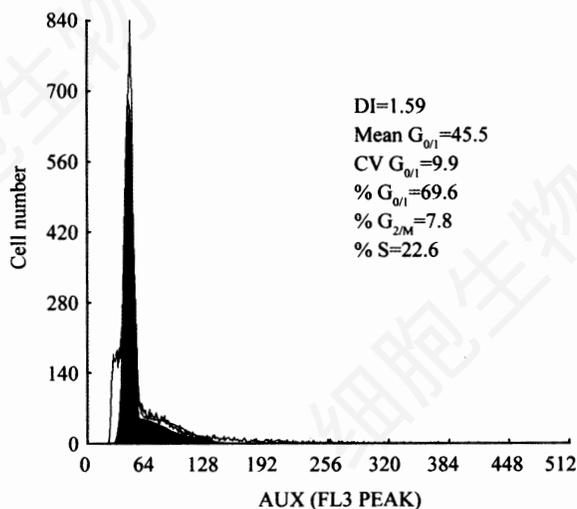


图4 大黄鱼三倍体鱼苗细胞 DNA 荧光分布直方图

经诱导处理的样本共检测 182 个，三倍体检出率为 12.09%，其中有一组检出率高达 55.56%，见表 3。流式细胞仪给出的对照组细胞 DNA 含量荧光分布直方图见图 3，三倍体细胞 DNA 含量荧光分布直方图见图 4。

### 3 讨论

#### 3.1 误差来源及控制

**3.1.1 细胞悬液制备过程控制** 在鱼种血液抽取时由于血管过细不能通过静脉抽血的方法抽取。我们将鱼解剖后从心脏加抗凝剂直接取血。在组织细胞悬液制作过程中，通过 300 目钢丝网过滤，去除未分离单细胞的组织，再用低速离心，去除细胞碎片。细胞悬液应做细胞涂片，观察细胞的完整性和细胞量。

**3.1.2 设备控制** (1)仪器调校 仪器的稳定性取决于仪器控制放大电子系统、激光器系统和流动系统的稳定。在电子系统和激光器正常工作情况下对分析和分离结果影响最大的因素是液流系统的稳定性。经常保持管道和喷嘴的清洁是最重要的。采用标准样品校正仪器不仅能判断光学系统的准直聚焦是否达到最佳状态，还能判断液流系统和喷嘴内是否有杂质和微小气泡存在。(2)细胞流速控制 细胞流速是影响分离细胞纯度的另一个重要因素。细胞经喷嘴喷射出来，如果细胞流速太快，机器有可能会发生漏判或错判，导致分离纯度的下降。

#### 3.2 染色体制片分析

目前大黄鱼等鱼的三倍体研究文献<sup>[6-8]</sup>中，主要是通过染色体制片，计数染色体数来确定三倍体及倍化率，已确定大黄鱼二倍体即正常大黄鱼的染色体数为 48 条，三倍体为 72 条，48 条至 72 条之间为非整倍体。

本研究所用的样本是群体胚胎，在分析中没有计算胚胎的倍化率，只是定性分析处理组有没有三倍体细胞存在，为流式细胞仪检测提供依据。实际上，在生产中群体胚胎倍性检测只能作为三倍体定性分析的方法。如果胚胎倍性检测要作为定量检测的方法，那么最好能够制作单胚胎染色体片。

#### 3.3 细胞周期分析

比较对照组的各生长阶段的细胞增殖指数可见 1~3cm 全长鱼苗细胞处于增殖较旺盛时期，该时期的 PI(62.07±8.56)是成鱼期 PI(6.13±1.29)的 10 倍多(表 1)。

在同一生长期(即全长 1~3 cm 鱼苗期)，二倍体的细胞增殖指数平均值 PI(62.07±8.56)显著高于三倍体细胞增殖指数平均值 PI(19.10±5.22)。这从某种程度上说明生长期的三倍体鱼在生长上并没有占优势。

#### 3.4 染色体变异

流式细胞仪检测在人的肿瘤细胞检测中应用较多, 肿瘤细胞的染色体通常发生变异, 表现为细胞 DNA 含量出现变异, 在流式细胞仪检测中可以观察到 CV 增大, 并出现异倍体峰值。正常的体细胞染色体 CV 应该小于 3。大黄鱼正常细胞流式细胞仪检测的结果是 CV 值小于 3, 应该属于正常值。根据 DI 值确定的三倍体细胞 CV 值范围为 9.9~16.8, 其他经三倍体处理的细胞 CV(数据省略)均大于 8, 这可能是处理组细胞染色体发生变异。这一现象表明三倍体处理可能不仅仅是产生或不产生三倍体的问题。三倍体处理究竟对染色体起了什么样的作用还需要作进一步的研究。

### 3.5 流式细胞仪检测大黄鱼三倍体可行

对于任何一种鱼来说, 处理时刻、处理强度和 处理时间这 3 个因素是确定休克法诱导三倍体的关键。用流式细胞仪进行 DNA 倍性检测分析, 结果表明在 182 个个体中有 12.09% 的个体是三倍体。

其中冷休克组 2 的诱导率最高, 达 55.56%, 其次是冷休克组 3 达 43.75, 而静水压组的诱导率不到 10%, 表明大黄鱼三倍体的诱导以冷休克方法为佳。

本研究为 大黄鱼三倍体诱导方法和倍化率的检测鉴定提供了依据。通过研究我们认为样本个体细胞的提取, 特别是肌肉组织的剪碎、研碎以及离心去碎细胞的具体操作技术是检测准确的前提; 流式细胞仪的保养与校验是检测顺利进行的保证; 在每批次的检测中以二倍体个体细胞 DNA 作为对照是不可避免的。

### 参考文献 (References)

- [1] Van dilla MA *et al.* *Science*, 1969, **163**: 1213
- [2] Mishiba KI *et al.* *Plant Sci*, 2000, **156**: 213
- [3] 张双喜等. *军事医学科学院院刊*, 1991, **15**: 311
- [4] 张鲁榕等. *第二军医大学学报*, 1991, **12**: 179
- [5] 李旭军等. *现代实用医学*, 2002, **14**: 234
- [6] 林 琪等. *海洋科学*, 2001, **25**(9): 6
- [7] 王 军等. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2001, **40**: 927
- [8] 尤 锋. *海洋与湖沼*, 1993, **24**: 248

## Triplont Analysis of *Pseudociaena crocea* by Flow Cytometry

Chun-Jing Zheng\*, Xiong-Fei Wu, Dong-Hai Liu<sup>1</sup>, Sun Zhang<sup>1</sup>

(Ningbo Academy of Ocean and Fishery, Ningbo 315012, China; <sup>1</sup>Ningbo No.2 Hospital, Ningbo 315010, China)

**Abstract** The authors try to establish the method for polysomaty analysis of *Pseudociaena crocea* by flow cytometry. *Pseudociaena crocea* fertilized eggs were shocked by cold or stress. After the chromosomes of gastrulae in the experimental groups were analysed. The triploid cells were sured in the experimental group. Then the group is cultivated to full-length 1–3 cm fingers. And analysis of cells' chromosomes content of the fingers was made by flow cytometry. If the chromosomes content peak value of the finger in the experimental group is 1.5 in the control. This means the finger is triplont. The results show that 12.09% are triplonts of the 182 samples in the experimental groups. And 55.56% are triplonts in the one of experimental groups.

**Key words** *Pseudociaena crocea*; triplon; flow cytometry; analysis

Received: October 8, 2005 Accepted: February 24, 2006

This work was supported by the Ningbo Technology Bureau (No.01N40111, No.2003A62014)

\*Corresponding author. Tel: 86-574-87466892, E-mail: chunjingzheng@hotmail.com