

麦穗鱼的组型分析和 DNA 含量测定

杨 坤¹ 王子健² 祝东梅¹ 方礼豹¹ 王卫民¹

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

摘要 采用 PHA 和秋水仙素活体注射、肾细胞短期培养和空气干燥制片法, 对麦穗鱼染色体数目和核型进行研究; 以麦穗鱼外周血细胞为样本, 鸡血细胞 DNA 为标准(2.30 pg), 使用美国贝克曼库尔特公司 Cell Lab Quanta SC 流式细胞仪测定了麦穗鱼二倍体细胞的 DNA 含量。结果显示: 麦穗鱼染色体数目 $2n=50$, 未观察到次缢痕及性染色体, 亦未发现随体, 核型公式为 $18m+22sm+10st, NF=90$; 麦穗鱼二倍体细胞 DNA 含量为鸡血对照的 1.38 倍, 绝对含量为 3.18 pg。

关键词 麦穗鱼; 染色体; 核型分析; 流式细胞术; DNA 含量

中图分类号 Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)03-0371-05

麦穗鱼 (*Pseudorasbora parva*), 属鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 鮡亚科 (Gobiominae) 麦穗鱼属 (*Pseudorasbora*), 起初分布于亚洲中部(中国、蒙古、韩国、日本等), 后随着经济鱼类的引种被带入欧洲地区, 现广泛分布于亚洲、欧洲、非洲的阿尔及利亚等地^[1-2]。麦穗鱼是一种常见的淡水小型鱼类, 其分布广泛, 在鱼类养殖生产中属于野杂鱼, 常被视为清除对象, 但有时也作为经济鱼类的一种饵料鱼。麦穗鱼生长速度快, 在室内室外均容易养殖, 分批产卵, 1 龄便可达性成熟, 且对环境耐受能力强, 因此其具有被开发成为一种新的模式鱼种的潜能。

目前关于麦穗鱼的研究主要涉及其生长繁殖、食性、毒理等方面^[3-4], 而对其染色体和 DNA 含量的研究较少^[5-8]。染色体是生物遗传物质的主要载体, 其数目和形态不仅具有种的特征, 且能反映出生物进化的历史。研究鱼类染色体核型对了解鱼类的遗传组成、遗传变异、系统演化、发育机制等具有重要意义^[9]; 脱氧核糖核酸(DNA)是绝大多数生物的遗传物质, 一个细胞核中所含的 DNA 总量对于某物种是一定的。生物 DNA 含量的研究不仅是研究物种间差别的重要方法, 而且对分类和系统演化的探讨、物种进化研究等具有参考意义, 也是种质资源

和种质质量的主要指标之一^[10]。因此, 笔者对麦穗鱼的染色体核型和 DNA 含量进行研究, 以期为开发麦穗鱼成为模式鱼种方面的研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试麦穗鱼取自湖北省武汉市江夏区汤逊湖, 3 雄 1 雌, 体长 78~85 mm, 体质量 7~10 g, 在室内水族箱内暂养至少 1 周后开始试验。

1.2 麦穗鱼核型分析

肾细胞染色体标本的制备参照林义浩^[11]的植物血球凝集素(PHA)体内注射法。按照 10 $\mu\text{g/g}$ (鱼体质量)的剂量在麦穗鱼腹腔注射 PHA, 4 h 后再按照 8 $\mu\text{g/g}$ (鱼体质量)注射秋水仙素, 2 h 后取鱼剪鳃及断尾放血 15 min。解剖鱼体取肾脏组织, 置于盛有少量淡水鱼用生理盐水(PSF)的培养皿中, 并用镊子除去明显的血块和组织膜; 用镊子磨碎肾脏组织, 然后用 0.154 mm 过滤筛过滤, 取细胞悬液移入 15 mL 离心管中, 用吸管反复吹打数次, 然后在 1 000 r/min 条件下离心 3 次, 每次 5~6 min, 每次离心完后更换少量淡水鱼用生理盐水, 并轻轻混匀细胞悬液。

加 5~6 mL 0.5% KCl 溶液至离心管中, 混匀

收稿日期: 2011-03-03

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(水专项)中的“水环境监测的新技术、新方法研发与应用示范”课题(2009ZX07527-005)

杨 坤, 硕士研究生。研究方向: 鱼类遗传与育种。E-mail: ykwxdl@163.com

通讯作者: 王卫民, 教授。研究方向: 鱼类遗传与育种。E-mail: wangwm@mail.hzau.edu.cn

细胞并室温低渗处理 30 min, 低渗后 1 000 r/min 离心 9 min, 去掉上清液, 然后加入新配制的卡诺氏固定液($V_{\text{甲醇}} : V_{\text{冰醋酸}} = 3 : 1$)固定 15 min, 然后 1 000 r/min 离心 9 min, 并重复固定 2 次; 在最后一次固定并离心后, 弃去上清液, 加入 0.5 mL 卡诺氏固定液, 制成悬液并滴于预先冰冻过的载玻片上, 按常规空气干燥法制备染色体玻片。

将染色体玻片用 10% Giemsa 液(用 pH=7.4 的磷酸缓冲液(PBS)配制)染色 10 min, 最后用自来水简单冲洗, 随水倾去染液, 待玻片干燥后在显微油镜下选取 100 个分散良好、形态清晰、数目完整的中期分裂相, 用 Optimas 软件系统手工统计每个分裂相的染色体数目, 找出出现频率最高的染色体数目, 并确定其为该地区麦穗鱼的染色体数目, 然后选取 11 个数目完整的最佳中期分裂相显微拍照、放大、测量, 按 Levan 等^[12]的标准测量染色体的有关参数, 配组分析。

1.3 麦穗鱼 DNA 含量测定

用浸有肝素钠的 1 mL 一次性注射器在麦穗鱼尾静脉采血 0.2~0.5 mL, 然后加入到含有 1 mL 磷酸缓冲液(PBS)的 EP 管中, 在 4 °C 避光条件下用 DAPI 染料按 $V_{\text{样品}} : V_{\text{染液}} = 1 : 1$ 染色 5~10 min; 用同样的方法采集公鸡血液, 样品染色后用流式细胞仪(Cell Lab Quanta SC Analysis, 美国贝克曼库尔特公司)进行检测。

1.4 数据统计与分析

选择国际上通用的鸡血细胞 DNA 绝对含量(2.30 pg)作对照进行检测。测量数据和图由计算机进行相应资料处理, 然后将对照血样及被检样品的处理资料按照统计学方法进行计算、统计。麦穗鱼 DNA 含量依照以下公式计算:

$$P_1 = E_2 / E_1 \times P_2$$

式中: P_1 表示麦穗鱼血细胞的 DNA 含量, pg; P_2 表示对照鸡血细胞 DNA 含量, pg; E_1 表示鸡血细胞消光值; E_2 表示麦穗鱼血细胞消光值。

2 结果与分析

2.1 麦穗鱼的染色体数目

试验中选取 100 个中期分裂相染色体, 其计数结果见表 1。由表 1 可看出, 麦穗鱼染色体的数目为 45~51, 在 100 个中期分裂相中, 染色体数为 45~49 的细胞有 29 个, 染色体数为 50 的细胞有 66 个, 染色体数为 51 的细胞有 5 个。染色体数为 50

的细胞个数占观察细胞总数的 66%。因此, 可以确定该地区麦穗鱼体细胞的染色体数目为 $2n=50$ 。此外, 未观察到次缢痕及性染色体, 亦未发现随体。麦穗鱼的染色体中期分裂相照片见图 1。

表 1 麦穗鱼细胞染色体数目出现频率

Table 1 Frequency of occurrence of chromosome number in the cell of *P. parva*

染色体数目 No. of chromosomes	细胞数 No. of cells	出现频率/% Frequency of occurrence
45	1	1
46	5	5
47	9	9
48	5	5
49	9	9
50	66	66
51	5	5
合计 Total	100	100

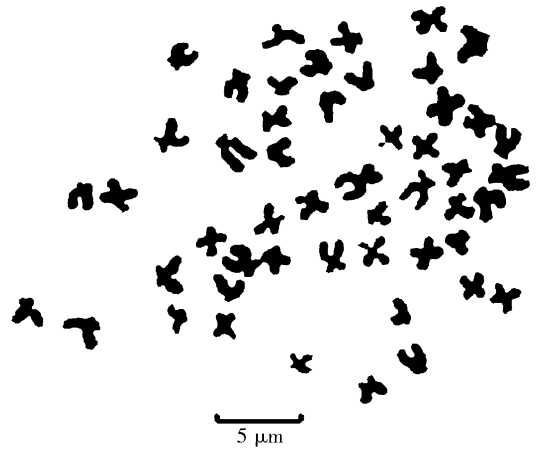


图 1 麦穗鱼肾细胞中期分裂相

Fig. 1 Metaphase chromosomes of kidney cell of *P. parva*

2.2 麦穗鱼的染色体核型

将 11 个形态清晰、数目完整的中期分裂相染色体拍照放大, 测定染色体长、短臂长度, 然后计算染色体的相对长度、臂比和着丝粒指数, 得到麦穗鱼的染色体核型指数(表 2)。根据表 2 的结果, 可将麦穗鱼二倍体体细胞 50 条染色体配成 25 对, 根据 Levan 等^[12]按照着丝点的位置进行染色体命名和分类的原则, 可将这 25 对染色体分为 3 组。其中中部着丝粒染色体(m)为 9 对, 亚中部着丝粒染色体(sm)为 11 对, 亚端部着丝粒染色体(st)为 5 对, 未发现端部着丝粒染色体(t), 因此麦穗鱼的核型公式表示为 $18m + 22sm + 10st$, 染色体臂数(NF)为 90。由此排列麦穗鱼的染色体核型见图 2。

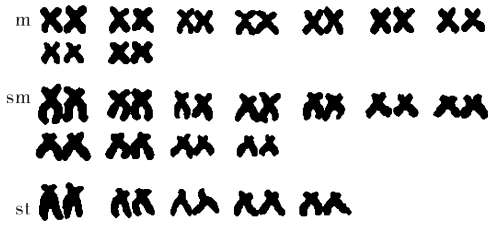


图 2 麦穗鱼染色体核型

Fig. 2 The karyotype of *P. parva*

表 2 麦穗鱼肾细胞中各染色体对的相对长度、臂比、着丝点指数及其分类类型¹⁾

Table 2 Relative length, arm ratio, centromeric index and classified types of each chromosome pair in kidney cells of in *P. parva*

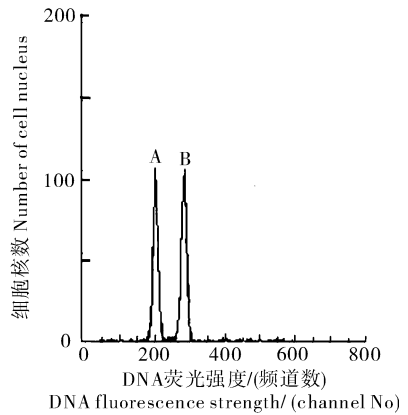
染色体序号 Chromosome No. (<i>n</i> =10)	相对长度/% Relative length (<i>M</i> ± <i>S</i>)	臂比 Arm ratio (<i>M</i> ± <i>S</i>)	着丝点指数 Centromeric index(<i>M</i> ± <i>S</i>)	类型 Types
1	4.35±0.46	1.01±0.19	49.56±6.75	m
2	4.18±0.38	1.01±0.09	49.54±5.71	m
3	4.03±0.40	1.10±0.25	47.62±4.62	m
4	3.95±0.25	1.02±0.21	49.51±3.81	m
5	3.80±0.21	1.06±0.21	48.48±3.97	m
6	3.76±0.34	1.04±0.19	48.98±8.87	m
7	3.69±0.32	1.04±0.19	48.96±3.79	m
8	3.18±0.32	1.02±0.24	49.40±3.72	m
9	3.14±0.36	1.16±0.11	46.34±6.24	m
10	5.18±0.78	2.29±0.38	30.37±4.32	sm
11	4.80±0.52	1.84±0.36	35.20±3.26	sm
12	4.45±0.45	1.90±0.37	34.48±3.09	sm
13	4.41±0.41	1.88±0.34	34.78±3.15	sm
14	4.11±0.44	1.89±0.24	34.58±5.28	sm
15	3.92±0.44	1.91±0.44	34.31±6.43	sm
16	3.92±0.48	2.00±0.30	33.33±2.58	sm
17	3.80±0.26	1.83±0.41	35.35±3.73	sm
18	3.45±0.44	1.73±0.35	36.67±2.68	sm
19	3.38±0.24	1.93±0.52	34.09±8.45	sm
20	2.80±0.49	2.17±0.28	31.51±2.46	sm
21	5.41±0.54	3.70±0.61	21.28±2.63	st
22	4.30±0.53	3.48±0.54	22.32±2.33	st
23	3.95±0.42	3.29±0.41	23.30±1.93	st
24	3.84±0.32	3.17±0.47	24.00±2.11	st
25	3.72±0.32	3.41±0.36	22.68±1.73	st

1) *n*: 细胞数 Cell count; *M*: 平均数 Mean value; *S*: 标准差 Standard deviation.

2.3 麦穗鱼的 DNA 含量测定

对 15 尾麦穗鱼的血细胞 DNA 含量进行了测定,测定结果为:麦穗鱼血细胞消光值为 275.32,公鸡血细胞消光值为 199.26,血细胞消光值比值(鱼/鸡)为 1.38,以公鸡血细胞 DNA 绝对含量值 2.30 pg 作为标准,可算出麦穗鱼血细胞 DNA 绝对含量

为 3.18 pg。麦穗鱼 DNA 含量的流式细胞仪图见图 3。



A: 表示鸡血细胞核 DNA 含量 DNA content of chicken erythrocyte nucleus; B: 表示麦穗鱼血细胞核 DNA 含量 DNA content of *P. parva* erythrocyte nucleus.

图 3 麦穗鱼和鸡血细胞 DNA 含量对照直方图

Fig. 3 DNA histogram of erythrocytes of *P. parva*

3 讨 论

3.1 麦穗鱼的核型分析

对鱼类染色体的研究,始于 1966 年 Ojima 等^[13]用低渗处理细胞和空气干燥法研究鲫和金鱼的染色体。随后,各国对鱼类染色体的研究越来越广泛,研究方法也逐步发展到用外周血液培养法、鳞上皮细胞培养和肾细胞培养法等方法。据报道,到 1983 年为止,已有 1 634 种鱼类的染色体被研究,占世界上现存鱼类的 8% 左右^[14]。而我国对鱼类染色体的研究始于 20 世纪 70 年代,据余先觉等^[15]报道,我国已有 200 多种鱼类被研究过。

关于麦穗鱼的染色体核型报道较少。Ojima 等^[5]最早报道了麦穗鱼的染色体数目为 $2n=50$,核型公式为 $14 m+36 sm$,臂数 $NF=100$ 。随后我国学者李树深等^[6]报道了麦穗鱼染色体数目为 $2n=50$,核型公式为 $20 m+26 sm+4 st$,臂数 $NF=96$;李康等^[7]报道麦穗鱼染色体数目为 $2n=50$,核型公式为 $18 m+22 sm+10 st$,臂数 $NF=90$ 。在这些研究结果中,染色体数目都为 $2n=50$,但其核型公式和臂数却不尽相同。本研究得出麦穗鱼的染色体数目为 $2n=50$,核型公式为 $18 m+22 sm+10 st$,臂数 $NF=90$,染色体数目与众学者研究结果相同,但是核型公式和臂数只与李康等^[7]报道的结果一致。因此可以推断麦穗鱼的染色体数目应该不具有多态性,至于各研究者对麦穗鱼核型公式研究结果的不

一致,可能是由于不同研究者所使用的方法、仪器不同,测量染色体的时相不一致,以及测量和配组误差所造成的。

小島吉雄^[14]在研究鱼类染色体时,曾将真骨鱼类划分为低位类、中位类和高位类 3 个演化类群,并探讨了鱼类的进化与染色体的关系,通过对大量资料的分析提出:在进化上越是处于上位的鱼类,其染色体越收敛,端着丝粒染色体多,臂数少。而从本试验结果看,麦穗鱼染色体核型中没有发现端部着丝粒染色体,可认为麦穗鱼在鱼类系统进化上属于低位类鱼类。

关于鱼类性染色体是否存在的问题,至今仍没有确切的说法。据统计,全世界大约有 2 000 多种真骨鱼类被做过染色体组型的研究,可能有近 100 种鱼类被认为有性染色体存在,而在细胞遗传学研究上能分辨出来的并且有较好性染色体形态分化的鱼类可能只有 40 种左右^[16]。在所有麦穗鱼染色体核型研究中均未发现性染色体,这是否与其性染色体处于进化的原始状态有关,仍尚待研究。此外,由于本研究采用常规染色方法,未观察到次缢痕及随体,在今后研究中需要采用染色体显带方法以进一步研究确认。

3.2 麦穗鱼的 DNA 含量

流式细胞仪是 20 世纪 70 年代末发展起来的一种能快速、准确测量细胞大小、DNA 含量的高技术仪器。目前,已广泛运用于鱼类、虾类等 DNA 含量和倍性检测^[17-18]。到目前为止,用流式细胞仪测定鱼类细胞含量的方法已比较完善和普遍。李渝成等^[8]曾运用显微分光光度计法测得麦穗鱼的 DNA 含量为 2.5 pg,所用的对照标准为人淋巴细胞;而本文采用流式细胞仪测得麦穗鱼 DNA 含量为 3.18 pg,所用的对照标准为鸡血(DNA 含量为 2.30 pg),所得结果与其报道的结果有差异,这差异可能是因所用方法、仪器及对照标准不同而产生的。

测定一种生物的 DNA 含量是研究其基因组的一个手段,它可以反映出该生物基因组大小、染色体数量和细胞倍性。然而,由于不同作者研究方法、仪器设备不尽相同,更重要的是使用的对照标准不同,因而使不同的研究结果失去了比较的意义。一般情况下,DNA 含量测定主要以人淋巴细胞、鸡血及鲑血细胞作为对照,本文采用鸡血作为对照,主要是因为鸡血为国际上通用的一种标准对照材料,且也容易获得。

近年来测定鱼类细胞 DNA 含量的方法主要是采用显微分光光度计和流式细胞仪 2 种方法,采用 2 种不同方法或仪器所测得的结果必定会产生一定的差异。例如仪器设计原理、型号、功能、标准对照材料(鸡血细胞、人淋巴细胞等)和绝对 DNA 含量标准(鸡血细胞,有人以 3.22 pg 计算,有人以 2.30 pg 计算,也有人以 2.50 pg 计算)的不同,甚至测量时人为操作,特别是采用显微分光光度计法时的人为操作都可能引起测量结果差异的产生。但是,以目前的技术水平来看,采用流式细胞仪测定鱼类 DNA 含量要比采用显微分光光度计法更准确些。与此同时,因流式细胞术操作方便、快速以及测量结果准确、客观,它在测定细胞 DNA 含量方面的应用将会更为广泛。

参 考 文 献

- [1] BRITTON J R, DAVIES G D, BRAZIER M. Towards the successful control of the invasive *Pseudorasbora parva* in the UK [J]. *Biol Invasions*, 2010, 12(1): 125-131.
- [2] BOLTACHEV A R, DANILYUK O N, PAKHORUKOV N P, et al. Distribution and certain features of the morphology and biology of the stone moroco *Pseudorasbora parva* (cypriniformes, Cyprinidae) in the waters of Crimea [J]. *Ichthyology*, 2006, 46(1): 58-63.
- [3] 秦玉丽, 李林春, 黄荣静. 麦穗鱼的生物学特性及养殖技术[J]. *江苏农业科学*, 2005(3): 114-116.
- [4] 王军, 吴继松, 李彩艳, 等. 锌离子胁迫下溴氰菊酯对麦穗鱼的急性毒性[J]. *安全与环境学报*, 2007, 7(4): 23-27.
- [5] OJIMA Y, HAYASHI M, VENO K. Cytogenetic studies in lower vertebrates. X. Karyotype and DNA studies in 15 species of Japanese Cyprinidae [J]. *Jap Genet*, 1972(47): 431-440.
- [6] 李树深, 王蕊芳, 刘光佐, 等. 八种淡水真骨鱼类的核型研究[J]. *遗传学报*, 1983, 5(4): 25-28.
- [7] 李康, 桂建芳, 洪云汉, 等. 中国理科鱼类染色体组型的研究(鲃亚科 10 种鱼的染色体组型) [J]. *武汉大学学报: 自然科学版*, 1984(3): 113-122.
- [8] 李渝成, 李康, 周敦. 十四种淡水鱼的 DNA 含量[J]. *遗传学报*, 1983, 10(5): 384-389.
- [9] 牛文涛, 蔡泽平. 中国海水鱼类核型研究概述[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2006, 45(2): 125-131.
- [10] 方旅平, 张馥厚, 曹文清, 等. 刀额新对虾和日本囊对虾细胞核 DNA 含量的测定与比较[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2007, 46(1): 146-148.
- [11] 林义浩. 快速获得大量鱼肾细胞中期分裂相的 PHA 体内注射法[J]. *水产学报*, 1982, 6(3): 201-204.
- [12] LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. *Hereditas*, 1964, 52(2): 201-220.

- [13] OJIMA Y, HITOTSUMACHI S, MAKINO S. Cytogenetic studies in lower vertebrates. 1. A preliminary report on the chromosomes of the funa (*Carassius auratus*) and goldfish (a revised study) [J]. Proc Jap Acad, 1966(42):62-66.
- [14] 小岛吉雄. 鱼类细胞遗传学[M]. 林义浩, 译. 广州: 广东科技出版社, 1991: 4, 8-33.
- [15] 余先觉, 周瞰, 李渝成, 等. 中国淡水鱼类染色体[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 87.
- [16] 杨东, 余来宁. 鱼类性别与性别鉴定[J]. 水生生物学报, 2006, 30(2): 221-227.
- [17] 范兆廷, 尹洪斌, 宋苏祥, 等. 四种鱼类外周血红细胞细胞周期及DNA含量[J]. 动物学报, 1995, 41(4): 370-374.
- [18] 张晓军, 周岭华, 相建海. 刀额新对虾染色体核型及细胞核DNA含量[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(3): 225-231.

Karyotypic analysis and cellular DNA contents of *Pseudorasbora parva*

YANG Kun¹ WANG Zi-jian² ZHU Dong-mei¹ FANG Li-bao¹ WANG Wei-min¹

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Abstract The chromosome number and karyotype of *Pseudorasbora parva* were analyzed using a routine method including intraperitoneal injection of PHA and colchicine, cultivation *in vivo*, and slides preparation with air-drying. Whilst erythrocyte nuclear DNA content of *P. parva* was determined by using a flow cytometer (Beckman Coulter Inc., USA) with serving the chicken erythrocytes (their DNA content is 2.30 pg) as reference cells. Results obtained in this study showed that: the diploid chromosome number of *P. parva* was 50 ($2n=50$); the karyotype of this species was $2n=18m+22sm+10st$, $NF=90$, while the secondary constriction, heterosome and satellite chromosome were not observed; the diploid cellular DNA contents of *P. parva* was 3.18 pg, which was 1.38 times to the chicken erythrocytes'.

Key words *Pseudorasbora parva*; chromosome; karyotypic analysis; flow cytometry; DNA content

(责任编辑: 边书京)