

鱼类染色体的白细胞-PHA 活体内 处理制片及其组型观察¹⁾

高 建 民

(福建师范大学生物系,福州)

目前, 鱼类染色体标本制备的方法主要是由 Yamamoto 等建立的肾细胞-PHA 体外短期培养法和 Ojima 等提出的外周血淋巴细胞离体培养法^[1,7,8], 以及活体注射 PHA 直接用肾组织的细胞制片等^[3,4]。用短期细胞培养研究鱼类染色体有较突出的优点, 它能保持染色体的自然状态, 染色体的形态特征较易于显示出来, 中期分裂相多, 染色体分散均匀、清晰。但细胞培养法需要有特定的条件, 在设备差或野外工作条件下不易做到, 而且程序繁琐、费时较长(一般需要 3 至 10 天)^[1], 在应用上受到一定的限制。直接用常规空气干燥法制片, 获得的中期分裂相少, 制片效果亦不理想^[4]。我们参照 Baker 在蛇类的工作^[9] 并稍加改良, 采用 PHA 活体内注射取外周血, 不需进行细胞体外培养和无菌操作制备鱼类染色体标本。由于使用这种方法可避免杀死动物, 因此也可以连续检查同一个体的染色体组型。我们所获得的初步结果, 为研究某些需要保持其继续存活的对象, 如稀有的杂交后代和通过细胞工程获得的少量实验对象的染色体提供了一个新途径。同时, 直接用从活体繁殖的细胞制片, 可以排除体外培养时可能出现的有害效应, 在环境监测中可望作为一种监测手段用于水质污染与鱼类染色体损伤相互关系的研究。

材 料 和 方 法

实验动物为大黑罗非鱼(安氏罗非鱼 *Tilapia andersonii*) 2♂、4♀, 采自福州市郊区水产局水技站, 体重 100—400 克。

具体操作步骤如下:

1. 前处理 将采来的活动物按 1—2 毫克/100 克体重的剂量进行腹腔注射植物血凝素 (PHA) (上海生物化学研究所生产), 24 小时后重复注射 1 次。再经 24 小时后取材。取材前 4—6 小时按 5 微克/每克体重的剂量腹腔注射秋水仙素溶液。

2. 取材及低渗处理 动物体表经局部碘酒与 70% 酒精消毒之后, 用 0.2% 肝素(130 单位/每毫克)湿润的消毒过的注射器, 自尾静脉采血约 0.2—1 毫升。在采血量较大(1 毫升以上)时, 可以先分离白细胞, 即将肝素抗凝血在 4℃ 冰箱中静置 1—2 小时, 或离心 (300—500rpm 3—10 分钟), 取上中层液。在全血或分离得的上中层液(含白细胞)加入 0.4% kcl3—4 毫升, 低渗 20—30 分钟。

3. 制片 按常规方法固定, 空气干燥法制片, Giemsa 染色。

4. 组型分析 染色体组型分析按丹佛会议(1960)常规, 染色体形态区分及命名, 参照 Levan 等(1964)的标准。

结 果 与 讨 论

从白细胞-PHA 活体内处理制片所获得的中期分裂相, 随机统计了 20 个视野, 得出细胞

Gao Jianmin: A Description of *in vivo* Technique for Chromosome Preparation in Fish (*Tilapia andersonii*) and Its Karyotype

1) 本实验得到丁汉波教授和张健老师的热忱指导, 特此致谢。

本文于 1985 年 3 月 13 日收到。

有丝分裂指数为 $2.01 \pm 0.96\%$ 。

根据 100 个可靠的中期分裂相的染色体计数, 确定大黑罗非鱼的二倍体染色体数目为 $44(2n = 44)$, 可配成 22 对。在一般观察的基础上, 选取其中 10 个分散好的中期分裂相照相放大, 测量和计算相对长度(该号染色体长度占单倍体总长度的百分值), 臂比指数(长臂/短臂)和着丝粒指数(短臂/该染色体长度), 结果见表 1。

表 1 大黑罗非鱼的染色体形态测量

编号	相对长度	臂比指数	着丝粒指数	着丝粒位置
1	14.05 ± 0.65	8.04 ± 0.15	11.09 ± 1.83	t
2	6.52 ± 0.38	2.40 ± 0.45	29.51 ± 3.29	sm
3	4.85 ± 0.22	6.94 ± 0.11	12.59 ± 2.15	st
4	4.82 ± 0.32	2.55 ± 0.06	28.17 ± 1.23	sm
5	4.79 ± 0.26	3.15 ± 0.13	24.11 ± 1.60	st
6	4.75 ± 0.28	2.11 ± 0.09	32.14 ± 1.71	sm
7	4.68 ± 0.22	2.04 ± 0.09	32.85 ± 1.69	sm
8	4.64 ± 0.32	5.83 ± 0.28	14.64 ± 2.94	st
9	4.28 ± 0.44	3.50 ± 0.06	22.22 ± 1.44	st
10	3.97 ± 0.20	5.50 ± 0.25	15.38 ± 3.16	st
11	3.90 ± 0.17	6.19 ± 0.12	13.91 ± 1.51	st
12	3.89 ± 0.19	2.12 ± 0.07	32.29 ± 1.19	sm
13	3.87 ± 0.14	5.71 ± 0.13	14.91 ± 2.37	st
14	3.86 ± 0.21	7.35 ± 0.25	11.97 ± 2.87	t
15	3.84 ± 0.18	4.38 ± 0.11	18.58 ± 2.27	st
16	3.56 ± 0.16	5.18 ± 0.13	16.19 ± 2.78	st
17	3.53 ± 0.22	4.78 ± 0.11	17.31 ± 2.30	st
18	3.52 ± 0.19	3.80 ± 0.09	20.85 ± 1.85	st
19	3.48 ± 0.15	7.55 ± 0.31	11.70 ± 3.68	t
20	3.19 ± 0.14	8.40 ± 0.28	10.64 ± 2.94	t
21	3.05 ± 0.18	5.43 ± 0.12	15.56 ± 2.34	st
22	2.99 ± 0.21	4.50 ± 0.15	18.18 ± 1.83	st

图版 1 为大黑罗非鱼染色体组型图, 按染色体的长度由大到小的次序排列。第 1 对染色体是具端着丝粒的最大染色体, 其长度显著地大于其他染色体, 容易识别。第 2 对为仅次于第 1 对的大型染色体, 其臂比指数, 在有些细胞近似近端着丝粒染色体, 但从多数细胞平均值看, 仍为近中着丝粒染色体。其余 20 对的大小相差无几, 其中第 4、6、7、12 对为近中着丝粒染色体, 第 14、19、20 为端着丝粒染色体, 余下均为近端着丝粒染色体。因此大黑罗非鱼染色

体组型公式似可定为 $10sm + 26st + 8t$, $NF = 54$ 。比较两性个体间染色体组形态上的特征, 没有观察到相对应的染色体对有形态上的差别。此外, 在所观察的细胞中, 也未发现有次缢痕及随体等标志性特征。

大黑罗非鱼是安氏罗非鱼 (*T. andersonii*) 的通称, 属于鲈形目 (Perciformes) 鲷鱼科 (Cichlidae) 罗非鱼属 (*Tilapia*)。该属大约有 100 多种, 是原产于非洲的具优良养殖性状的热带鱼, 我国已引种的有 10 多种。为了提高罗非鱼的产量, 近年来国内外都作了大量的研究。因此进行罗非鱼细胞遗传学的研究也有重要意义。Kornfield 根据对鲷鱼科 4 个属的 6 种鱼核型的研究^[6], 认为它们核型模式的一般特征是: 除第 1 对为特大的染色体外, 还有 15—17 对近端着丝粒染色体和 3—5 对近中着丝粒染色体。国内陈敏容等也作过莫桑比克罗非鱼 (*T. mossambica*)、尼罗罗非鱼 (*T. nilotica*) 及加俐罗非鱼 (*T. galilaeus*) 染色体组型的比较研究^[2]。他们认为以上 3 种罗非鱼染色体组型均有 1 对特大的染色体, 4 对近中着丝粒染色体和 17 对近端着丝粒染色体。我们所研究的大黑罗非鱼的形态性状和这三种罗非鱼都有着明显的区别, 但它们的染色体组型特征都基本符合 Kornfield 的一般模式。看来, 仅用常规的染色体染色的方法, 难以区分罗非鱼属的各个种。目前我国鱼类染色体组型的研究, 已由个别种类的零星报道深入到科内或科间种类的比较研究。国内外对鲤科鱼类的研究^[3]认为, 该科鱼类的染色体基本二倍数为 $2n = 48—50$, 且以中着丝粒与亚中着丝粒占多数。鲈形目是鱼类中最大的一个目, 国内尚只有少数几种的报道。从已有的资料看来, 鲈形目鱼类与鲤科有显著的差异, 是以端着丝粒染色体占多数。一般认为, 随着鱼类的进化, 其染色体二倍数越收敛, 端着丝粒染色体增多, 染色体臂数减少。因此, 鲈形目鱼类在鱼类系统发生中是处于高位类群。

众所周知, 鱼类细胞的染色体比哺乳类的要小, 染色体数目亦多, 进行组型和带型分析有一定难度。近些年来, 随着鱼类细胞的培养及其

培养细胞的染色体标本制备技术不断改进与完善,鱼类染色体研究进展迅速。我们使用的这种白细胞-PHA 活体内处理制备的鱼类染色体标本,可以兼有离体培养法的一些优点。白细胞-PHA 活体内处理的关键在于 PHA 的注射剂量。据我们试验的结果,PHA 注射剂量应控制在 1—2 毫克/100 克体重以下;用量过大,超过 2 毫克/100 克体重时,实验鱼会出血、僵硬而死亡。当然,我们也要考虑到 PHA 的不同制品批号及其效价对细胞有丝分裂指数的影响。我们知道,PHA 是一类糖蛋白质,其作为淋巴细胞的非特异性有丝分裂原,不仅对血液中的淋巴细胞分裂有一定的刺激作用,而且对红细胞也有一定的凝集作用。PHA 对各种动物血的

凝集效价,可以作为其淋巴细胞培养中决定 PHA 定适宜加入量的一个重要依据。因此,事先测 PHA 对该动物血液的凝集效价,以确定 PHA 的适宜用量,有时是有必要的。

参 考 文 献

- [1] 吴政安: 1981. 动物学杂志, 2: 50—54。
- [2] 陈敏容等: 1983. 遗传学报, 10(1): 56—62。
- [3] 周敏: 1984. 动物学研究, 5(1)增刊: 38—46。
- [4] 林义浩: 1982. 水产学报, 6(3): 201—208。
- [5] Baker, R. J. et al.: 1971. *Experientia*, 15(10): 1228—1229。
- [6] Kornfield, I. I.: 1979. *Evolution*, 33:1。
- [7] Ojima, Y. et al.: 1970. *Jap. Jour. Genet.*, 45(2): 161—162。
- [8] Yamamoto, K. et al.: 1973. *ibid.*, 48(3): 235—238

灰 伏 翼 的 染 色 体 分 析

张 维 道

(安徽师范大学生物系,芜湖)

关于伏翼属的库氏伏翼、西方伏翼、小伏翼等的染色体, Baker^[3]、小原良孝^[2]曾分别作过分析。分布于我国深山岩洞中的灰伏翼 (*Pipistrellus pulveratus* PETERS) 的染色体,尚未见报道。本文仅对其常规核型作一分析。

材 料 和 方 法

本文所用灰伏翼系 1983 年秋天在安徽省休宁县采集。所用材料均是性成熟个体的肱骨、臂骨,采用经过改良的骨髓细胞制片法,空气干燥制片 Giemsa 染色。然后选取 10 个分散较好的分裂相摄影,剪贴、测量,根据 Levan 等^[6]方法按臂比指数进行染色体分类,按照染色体类型和相对长度排列编号。

观 察 结 果

共观察了 5 只性成熟个体 (3♀, 2♂) 的 150 个中期细胞分裂相。结果表明,灰伏翼骨髓

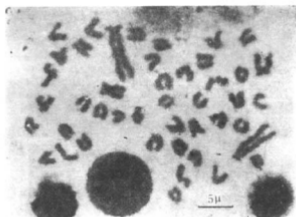
细胞二倍体染色体数为 $44(2n = 44)$, 染色体臂数为 $50(NF = 50)$ 。染色体测量结果见表 1, 组型图见图版 I、II。

在常染色体中,有 3 对大型的中部着丝粒染色体 (M), 1 对小型的中着丝粒染色体 (M), 17 对中小型的端着丝粒染色体 (T)。在 3 对大型 M 染色体间,由于臂比指数和大小相近,不易区分。那对小型中着丝粒染色体在整个核型中居第 12 位,很易识别。在端部着丝粒染色体中,有时在第 13 对染色体的近着丝粒处观察到有一次缢痕。第 19、20、21 三对染色体很小,较易识别,而其余的端着丝粒染色体,由于大小依次递减,很难区分。

灰伏翼的 X 染色体是 1 个中等大小的中部着丝粒染色体(相对长度为 5.81 ± 0.25 ; m), Y

Zhang Wedao: Chromosomes Analyses of *Pipistrellus pulveratus* Peters

本文于 1984 年 1 月 20 日收到,1986 年 4 月修回。



大黑罗非鱼淋巴细胞的染色体及其染色体组型