

黄扯旗鱼核型分析方法及核型特征

余陆伟 张梦茹 刘晨辉 王言豪 刘志伟*

上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306

摘要: 本研究的目的在于建立黄扯旗鱼 (*Pristella maxillaris*) 的核型分析方法, 以了解该物种的染色体数目、形态及分类等遗传学特征。比较头肾-PHA法和胚胎制片法制备黄扯旗鱼染色体样品的异同。结果发现, 头肾-PHA法难度较大, 操作复杂且制备的分裂相细胞数目较少; 而胚胎法操作简单, 用时短, 制备的分裂相细胞稳定且数目多。随后基于胚胎制片法利用 Photoshop CS5 和 image J 软件进行了黄扯旗鱼的核型分析。统计结果表明, 黄扯旗鱼核型为 $2n = 52 = 6m + 12sm + 34t$, $NF = 70$, 且未发现多倍体、异型性染色体及随体染色体的现象。

关键词: 黄扯旗鱼; 核型分析; 染色体

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2018) 01-99-07

Karyotyping the *Pristella Tetra* (*Pristella maxillaris*)

YU Lu-Wei ZHANG Meng-Ru LIU Chen-Hui WANG Yan-Hao LIU Zhi-Wei*

Shanghai Ocean University Fisheries and Life Science College, Shanghai 201306, China

Abstract: This study aimed to test a convenient and effective method for chromosome preparation and karyotyping in *Pristella Tetra* (*Pristella maxillaris*). The chromosome samples made from an embryo were compared with those made from the pronephros-PHA method. Then karyotype analysis was conducted by Photoshop CS5 and image J. We found that pronephros-PHA method was hard to manipulate, due to twice injections, dissection of pronephros in small fish, and less good chromosome samples. While embryo method was easy to manipulate, and steadily produced more good chromosome samples (Fig. 1). The results showed that the diploid chromosome number was $2n = 52$ and the karyotype was composed of $6m + 12sm + 34t$, $NF = 70$ (Fig. 2 and Table 1). No chromosome polyploidy, heteromorphic sex chromosome, and random chromosome segregation were found.

Key words: *Pristella Tetra* (*Pristella maxillaris*); Karyotype analysis; Chromosome

黄扯旗鱼 (*Pristella maxillaris*) 原产自于南美洲亚马逊河流域、委内瑞拉和圭亚那等地, 隶属脂鲤目 (Characins) 脂鲤科 (Characidae)

细锯脂鲤属。该鱼不仅胚胎透明, 成体也部分透明, 骨骼、肌肉等清晰可见, 腹部被覆银色腹膜, 肉眼不能直接观察到内脏器官。尤为突

基金项目 上海市教委创新项目 (No. 13YZ094), 上海海洋大学大学生创新计划项目 (No. xj2013011);

* 通讯作者, E-mail: zwliu@shou.edu.cn;

第一作者介绍 余陆伟, 男, 硕士研究生; 研究方向: 动物遗传育种; E-mail: m160101090@st.shou.edu.cn.

收稿日期: 2017-03-12, 修回日期: 2017-09-12 DOI: 10.13859/j.cjz.201801013

出的是黄扯旗鱼的变种玻璃扯旗鱼通体透明,肉眼可直接观察到内脏器官。同时该鱼经长期驯化可常年繁殖。因其兼具常年繁殖、产卵量大和成体透明等特点,拟将黄扯旗鱼应用于脊椎动物器官发育及疾病发生机理等研究领域,同时该鱼可应用于进化生物学及水生生物学的基础研究。本研究拟从核型分析入手进一步了其遗传背景,为该鱼的后续研究奠定基础。

染色体是细胞核中重要的组成部分,是生物遗传信息物质的主要载体。染色体组型具有物种特异性,且能反映物种的分化和形成过程、亲缘关系、演化途径和进化历史(楼允东等 1997)。近年来,鱼类染色体研究因其在分类、进化、遗传学以及鱼类育种学、自交系快速产生和细胞分类学方面的重要性而备受重视。自被 Weitzman 等(1997)发现至今,黄扯旗鱼的研究多集中在繁殖和养殖方面。而对其生物学方面的研究较少(PubMed 搜索关键词“*Pristella maxillaris*”,结果为 0),对其染色体方面的研究就更少,仅在 FishBase (<http://www.fishbase.org/search.php>)检索到 3 条对该属鱼染色体数目的报道。且这三个报道关于黄扯旗鱼染色体数目的结论不统一,有 48 条(Vasil'yev 1980, Arkhipchuk 1999)和 52 条(Klinkhardt et al. 1995)两种观点。

目前常规鱼类核型分析方法有头肾-植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)法、外周血培养法和胚胎制片法(余先觉等 1989,楼允东等 1997),多数经济鱼类主要采用头肾-PHA 注射法。本文采用头肾-PHA 法和胚胎制片法制备了黄扯旗鱼染色体样品并比较两者异同,然后基于胚胎法制备的染色体样品进行了核型分析。研究为理解黄扯旗鱼的遗传背景奠定了一定基础,也为后续的研究提供了理论和技术支持,同时也为小型热带观赏鱼的核型研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用鱼养殖在海圣循环水养殖系统中。实验用胚胎系实验室繁殖,实验前收集鱼卵置 28.5 °C 培养箱培养。取头肾的成鱼,体重为 0.4 ~ 0.6 g,体长 3 ~ 5 cm,约 4 ~ 5 月龄。

1.2 染色体标本的制备

1.2.1 头肾组织制备染色体方法 参照林义浩(1982)的方法利用头肾制备染色体样品,并适当调整。体腔注射植物血凝素(0.1 ml/尾,注射一次)于 10 尾黄扯旗鱼成鱼,20 h 后,注射 12 mg/L 秋水仙素(0.1 ml/尾,注射一次),3 h 后,取鱼,断尾,解剖取头肾,尽量去除头肾的结缔组织与脂肪,于 0.85%生理盐水中清洗 2 ~ 3 遍,除去血块及其他组织,转移至 0.5 ml 离心管,用镊子夹碎组织,用 800 目绢纱过滤制成细胞悬液,分装;34.5 °C 下,0.3% ~ 0.4% KCl 溶液处理 1 h;1 500 r/min 离心 10 min,去上清,加入新配制的卡诺氏固定液(-20 °C 预冷),冰中固定 30 min,重复 2 次;用滴管在距离玻片 2 m 处滴片(过高不易操作,太低效果不好),滴量约 20 μ l;自然干燥后于吉姆萨染液染色 15 ~ 20 min 观察。

1.2.2 胚胎制备染色体方法 参考宋立民等(2011)及 Westerfield(2007)的方法,取 20 颗发育至体节期前(受精后 12 h)的胚胎置于 0.5 ml 离心管,加入 4 g/L 的秋水仙素 400 μ l 处理 1 h;取胚胎,用 0.85%生理盐水清洗 2 次,1.1%柠檬酸钠中剥离卵黄,保持完整胚胎,放置 3 ~ 5 min,将胚胎转移至一个滴有 0.8%柠檬酸钠的培养皿于冰上处理 8 min;固定,将处理后的胚胎转移至 0.5 ml 离心管中,每 3 个胚胎一个离心管,加入 400 μ l 固定液(甲醇与冰醋酸体积比为 3 : 1)处理 20 min;换新的固定液(注意不要吸走胚胎),放入 -20 °C 冰箱中,过夜;取出固定好的胚胎加入 1 ~ 2 滴 50%冰醋酸,用枪头捣碎后,再加入 50%冰醋酸至 100 μ l;之后,滴至 50 °C 烘热的玻片,滴片高度为 1 m 左右;吉姆萨染液染色 15 ~ 20 min 后观察。

1.3 染色体图像处理及染色体组型分析

1.3.1 染色体图像处理 利用 Olympus CX21 显微镜低倍观察找到分散良好的细胞, 用记号笔在载玻片背面标记染色体所在区域后用中性树脂封片, 然后用 Zeiss 710 激光共聚焦显微镜于 63 倍油镜下拍照。从染色体分散良好的细胞中挑取 100 个分散较好的中期染色体分裂相, 用 Photoshop CS5 软件计数, 同时利用 Image J 软件对染色体进行形态分析和测量, 包括长臂和短臂的测量并用 Microsoft excel 软件统计分析。

1.3.2 染色体组型分析方法 黄扯旗鱼染色体核型分析方法采取 Levan 等 (1964) 提出的标准, 即按臂比 (长臂长度/短臂长度) 将染色体分为中部着丝粒染色体 (metacentrics, m)、亚中部着丝粒染色体 (submetacentrics, sm)、亚端部着丝粒染色体 (subtelocentrics, st)、端部着丝粒染色体 (telocentrics, t) 进行分析。臂数 (NF) 根据 Matthey (1967) 方法进行统计。

1.4 染色体 DNA 含量测定

1.4.1 样品制备 用一次性 1 ml 注射器吸取 0.1 ml 0.2% 肝素钠溶液, 抽取约 0.1 ml 鸡血, 待用; 取一尾黄扯旗鱼, 断尾, 取血 (见血即可); 2 mg/L DAPI 染色液待用; 将鸡血和鱼血、DAPI 加入 3 ml 试管中, 然后用 PARTEC 染色体倍性分析仪 (CyFlow ploidy Analyser) 检测。对照组采用实验室 AB 系正常二倍体斑马鱼。

1.4.2 结果处理 样品鱼 DNA 绝对含量依照以下公式计算: $P_1 = (E_2/E_1)P_2$ (殷文建等 2015, 吴成宾等 2013), 式中, P_1 表示检测鱼红血球的 DNA 绝对含量 (pg), P_2 表示标准鸡红血球 DNA 绝对含量 (2.50 pg), E_1 表示鸡红血球相对 DNA 含量, E_2 表示检测鱼红血球相对 DNA 含量 (相对 DNA 含量值为染色体倍性分析仪显示结果)。根据 DNA 指数 (DNA index, DI), 即一组细胞的 DNA 含量与正常二倍体 DNA 含量比值, $DI = 1.0 \pm 0.1$ 为二倍体, $DI = 1.5 \pm 0.15$ 为三倍体 (耿波等 2008),

2 结果

2.1 头肾-PHA 法和胚胎制片法制备染色体的比较

头肾-PHA 法、胚胎制片法和外周血制片法是鱼类染色体经典的制片方法。本文同时采用胚胎制片法和头肾-PHA 法制备黄扯旗鱼染色体, 并分析两者异同。用头肾制备的染色体分裂相较差, 染色体间出现较为严重的重叠, 且染色体模糊不清 (图 1a~c); 而用胚胎制备的染色体分裂相较好, 染色体重叠较少 (图 1d~f), 可清晰分辨出染色体形态及结构。同时还比较了头肾和胚胎制备染色体的中期分裂相获得率 (图 1g~h)。取头肾和胚胎染色体样品各 5 个随机统计其 15 个视野中细胞数的平均数, 头肾及胚胎制备的染色体样品中细胞数分别为 (338 ± 82.4) 个、 (452 ± 185.0) 个, 两种方法制备的染色体样品中细胞密度无明显差异 (T 检验 $P > 0.05$)。但头肾-PHA 法、胚胎制片法制备的染色体样品中获得的分裂相比例分别为 0.010 ± 0.005 、 0.020 ± 0.010 , 差异显著 (T 检验, $P < 0.05$), 胚胎制片法制备的染色体样品中期分裂相较头肾-PHA 法的多, 且样品稳定性高。即制备黄扯旗鱼染色体样品时胚胎法较头肾-PHA 法好且稳定。

2.2 黄扯旗鱼染色体数目

基于胚胎法制备的染色体样品分析了黄扯旗鱼的染色体数目。随机统计黄扯旗鱼 100 个细胞中期分裂相的染色体数目, 其中, 染色体为 35 条的 1 个, 36 条的 3 个, 38 条的 1 个, 42 条的 4 个, 43 条的 1 个, 44 条的 3 个, 45 条的 1 个, 46 条的 4 个, 47 条的 4 个, 48 条的 8 个, 49 条的 1 个, 50 条的 7 个, 51 条的 8 个, 52 条的 48 个, 53 条的 1 个, 54 条的 5 个。统计结果显示, 染色体数目低于 48 条的分裂相 30 个; 染色体数为 49~50 条的分裂相为 8 个; 染色体数为 51~52 的达 56 个; 染色体数大于 52 仅 6 个。依据众数原理, 实验结果倾向支持黄扯旗鱼二倍体染色体数目为 $2n = 52$ 的观点。

2.3 黄扯旗鱼的染色体核型

根据染色体臂比的统计结果 (表 1), 黄扯

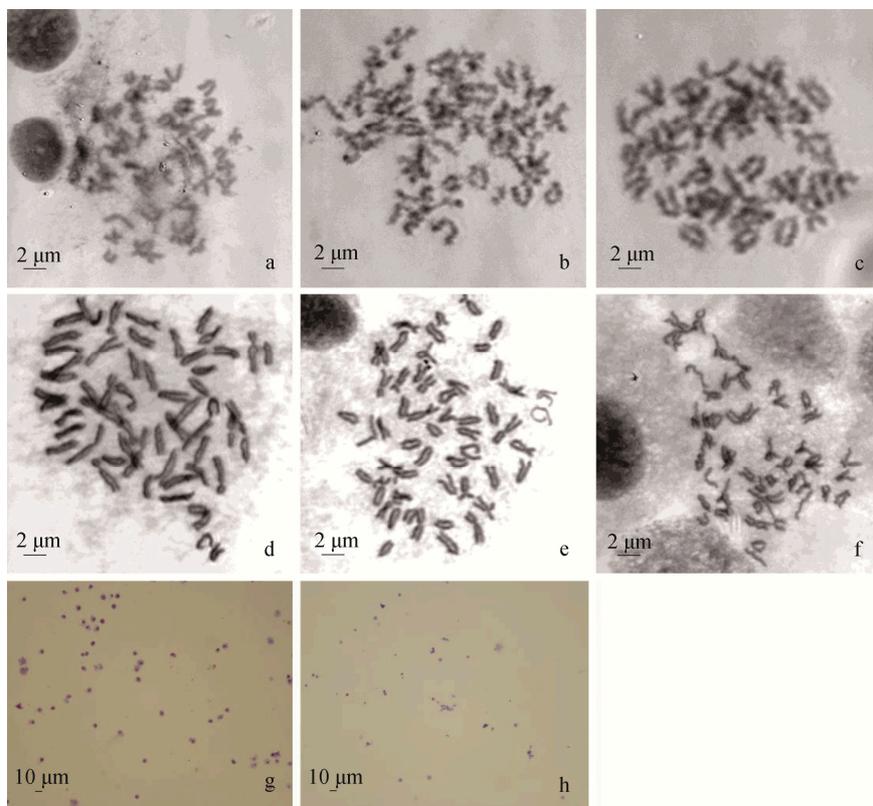


图 1 黄扯旗鱼头肾及胚胎染色体制片对比

Fig. 1 Comparison of chromosome preparation with two methods

a ~ c. 头肾-PHA 法制备的染色体样品中任意 3 个细胞分裂相; d ~ f. 胚胎法制备染色体样品中任意 3 个细胞分裂相; g. 胚胎法制备的染色体样品; h. 头肾-PHA 法制备的染色体样品。

a - c. Chromosome preparation by head-kidney method; d - f. Chromosome preparation by embryo method; g. Cells prepared by embryo method; h. Cells prepared by head-kidney method.

旗鱼染色体中部着丝粒染色体 (m) 3 对, 亚中部着丝粒染色体 (sm) 6 对, 亚端部着丝粒染色体 (st) 0 对, 端部着丝粒染色体 (t) 17 对, 核型公式为 $2n = 6m + 12sm + 34t$, 染色体总臂数 NF 为 70。染色体相对长度为 1.9% ~ 5.81%。没有发现与性染色体相关且形态不同的染色体, 也没有发现随体。黄扯旗鱼的中期染色体分裂相以及核型分组见图 2。

2.4 黄扯旗鱼的 DNA 含量和倍性分析

对测定的黄扯旗鱼与标准样 (2.50 pg)、参照值测定的斑马鱼相对 DNA 含量绝对统计结果见表 2。根据表 2, 利用公式计算得黄扯旗鱼 DNA 含量约为 3.97 pg, 斑马鱼 DNA 含量与黄

扯旗鱼 DNA 含量之比为 0.96 : 1, 比值接近 1。根据 DNA 指数判断依据, 所检测的黄扯旗鱼为二倍体。

3 讨论

3.1 两种染色体制片方法的比较

本文分析比较了胚胎法及头肾-PHA 法制备黄扯旗鱼染色体样品的异同, 旨在优化黄扯旗鱼核型分析方法。结果表明, 用头肾制备的细胞分裂相较差, 染色体模糊; 而胚胎法制备的分裂相较好, 染色体清晰且形态及结构完整。这两种方法都是经典的鱼类染色体制备方法。对于两种方法制备的结果差异, 研究认为可能

表 1 黄扯旗鱼的核型参数 (平均值 \pm 标准差, $n = 8$)**Table 1 The karyotype indices of *Pristella Tetra***
(Mean \pm SD, $n = 8$)

序号 No. of chromosome	相对长度 (%) Relative length	臂比 Arm ratio	染色体类型 Chromosome type
1	1.90 \pm 0.36	1.2 \pm 0.1	m
2	2.35 \pm 0.09	1.9 \pm 0.6	sm
3	2.62 \pm 0.26	1.8 \pm 0.6	sm
4	2.63 \pm 0.14	2.3 \pm 0.6	sm
5	2.72 \pm 0.08	2.2 \pm 0.5	sm
6	2.84 \pm 0.14	2.2 \pm 0.4	sm
7	3.08 \pm 0.16	2.3 \pm 0.5	sm
8	3.50 \pm 0.17	1.3 \pm 0.1	m
9	3.73 \pm 0.20	1.7 \pm 0.5	m
10	5.81 \pm 0.26	> 7	t
11	5.46 \pm 0.11	> 7	t
12	5.24 \pm 0.15	> 7	t
13	5.05 \pm 0.21	> 7	t
14	4.90 \pm 0.19	> 7	t
15	4.72 \pm 0.17	> 7	t
16	4.55 \pm 0.16	> 7	t
17	4.48 \pm 0.15	> 7	t
18	4.42 \pm 0.13	> 7	t
19	4.34 \pm 0.17	> 7	t
20	4.27 \pm 0.13	> 7	t
21	4.08 \pm 0.24	> 7	t
22	3.95 \pm 0.22	> 7	t
23	3.69 \pm 0.17	> 7	t
24	3.47 \pm 0.23	> 7	t
25	3.26 \pm 0.34	> 7	t
26	3.06 \pm 0.29	> 7	t

由以下原因造成: 一、头肾法需两次注射, 注射 PHA 刺激细胞增殖及注射秋水仙素抑制纺锤丝形成以阻断细胞分裂过程, 得到处于不同分裂时期的细胞。由于黄扯旗鱼体型小, 要想得到稳定可靠的结果对注射的熟练度要求较高, 在实验中常因注射 PHA 和秋水仙素的时机及注射部位无法准确把握等原因导致制备的细胞分裂相较差。而胚胎法仅需将分裂旺盛的胚胎浸泡于秋水仙素溶液中即可, 处理过程简单、

稳定性高。二、使用头肾为材料, 步骤较多, 实验周期长。且头肾法需在前处理后从体型较小的黄扯旗鱼体内解剖头肾, 操作难度较大, 在操作过程中难以把握, 进而影响实验结果的稳定性和效果。而胚胎法步骤少, 周期短, 实验过程可控性强。三、头肾-PHA 法两次注射对黄扯旗鱼这种小型鱼类造成的伤害较大, 从而也加剧了头肾-PHA 法的不稳定性。因此我们后续的核型分析均基于胚胎法制备的染色体样品进行。同时实验室已实现黄扯旗鱼的稳定繁殖 (9 d 一个周期), 能为开展基于胚胎法进行核型分析的工作提供物质保障。实验为小型鱼类, 如灯科鱼类等小型热带观赏鱼的核型分析提供了更加简便、稳定的方法, 为研究这类鱼的遗传背景提供更加有效的方法。

3.2 黄扯旗鱼的核型分析及倍性

黄扯旗鱼因其在体透明的特点, 在脊椎动物器官形成和疾病发生机理研究方面具有重要的潜在价值。关于黄扯旗鱼核型分析的研究国内外均少有报道, 且报道结果不一致, 有 48 条 (Vasil'yev 1980, Arkhipchuk 1999) 和 52 条 (Klinkhardt et al. 1995) 两种观点。鉴于染色体核型分析对了解鱼的遗传背景、进化的重要意义, 本实验基于胚胎法制备的染色体进行了黄扯旗鱼的核型分析。结果表明, 黄扯旗鱼的染色体核型数目 $2n = 52$, 其核型组成为 $6m + 12sm + 34t$, $NF = 70$ 。该结果支持黄扯旗鱼染色体数为 52 的观点。同时该鱼的染色体倍性分析实验表明其为二倍体。本研究初步阐明黄扯旗鱼的染色体数目及核型组成, 为后续的基因定位、多倍体、性染色体及进化相关研究提供了前期基础。

目前大多数核型分析方法是参照 Levan 等 (1964) 所给的命名、分类标准进行配对和排列。在统计染色体数目发现有 $2n$ 小于 52、大于 52 等多种情况。这样现象可能是由于制备时细胞染色体的丢失以及其他邻近细胞染色体的参入, 抑或是染色体部分重叠在一起导致计数时无法准确判断。同时, 在进行配对时常规染

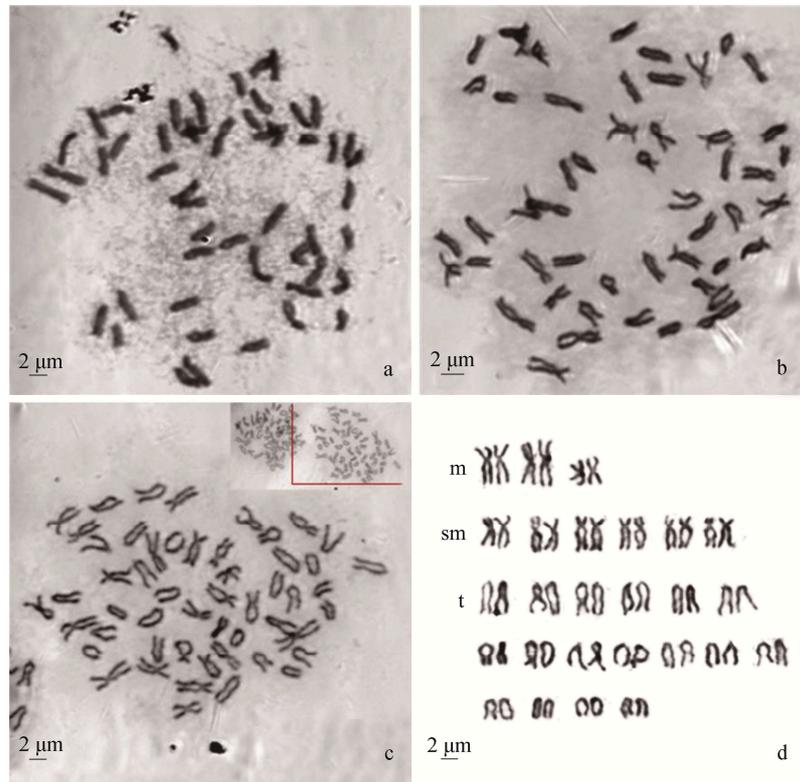


图 2 胚胎法制备黄扯旗鱼的染色体及核型

Fig. 2 Karyotype analysis of the *Pristella Tetra* from metaphase chromosomes prepared by embryo method

a. 染色体早中期; b. 染色体晚中期; c. 物镜 63 倍的激光共聚焦显微镜成像结果, 红色框内为低倍镜下的同一染色体图像; d. 黄扯旗鱼染色体核型: m. 中部着丝点染色体; sm. 亚中部染色体; t. 端着丝粒染色体。

a. Prometaphase chromosome; b. Late-metaphase chromosome; c. The chromosomes imaging with confocal microscopy; the inset picture by red box: the same chromosome in low-magnification. d. Karyotype analysis of the *Pristella maxillaries*: m. Metacentric chromosome; sm. Submetacentric chromosome; t. Telocentric chromosome.

表 2 流式细胞仪检测黄扯旗鱼的 DNA 含量

Table 2 DNA content of *Pristella Tetra* by flow cytometry

动物 Species	样本数 (尾) Sample size (ind)	检测细胞数 Cell number	相对 DNA 含量 Relative content of DNA	相对 DNA 含量比 (鱼/鸡) Content ratio of DNA	DNA 含量 Content of DNA (pg)	倍性 Ploidy
鸡 Cock	1	1 217	32.69			
斑马鱼 Zebra fish	1	931	50.57	1.52	3.80	2
黄扯旗鱼 <i>Pristella Tetra</i>	1	2 036	52.06	1.59	3.97	2

色方法易导致不同分裂相的染色体会产生配对误差; 也有可能因染色体处于细胞周期不同时期从而存在一定的形态差异 (图 2), 致使测量臂长和染色体配对时出现偏差; 再加上处理过程中, 细胞被处理的时间不一样, 较难获得同

一细胞周期的染色体分裂相, 因此即便基于同一条鱼的不同分裂相开展的核型分析结果也会存在一定差异。同时实验表明, 一些染色体之间的相对长度、臂比及形态相似, 如中部着丝粒染色体 (m) 的第 8 和第 9 对染色体, 亚中

部着丝粒染色体(sm)中第4至第7对染色体, 端部着丝粒染色体(t)中第10至第13对染色体、14和15对染色体、16至22对染色体以及23至26对染色体之间。因此, 在后续的研究中可通过染色体显带技术(C带技术、G带技术、银带技术等)及荧光原位杂交提高核型分析的分辨率, 对黄扯旗鱼染色体精确配对, 并分析黄扯旗鱼染色体数目差异是因细胞染色体丢失还是因邻近细胞染色体的掺入造成。

参 考 文 献

- Arkhipchuk V V. 1999. Chromosome database. Database of Dr. Victor Arkhipchuk. Fishbase World Wide Web electronic publication. Version (02/2007).
- Klinkhardt M, Tesche M, Greven H. 1995. Database of fish chromosomes. Westarp Wissenschaften.
- Levan A, Fredga K, Sandberg A A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2): 201-220.
- Matthey R. 1967. Cytogenetic Mechanisms and Speciations of Mammals. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(3): 163-167.
- Vasil'ev V P. 1980. Chromosome numbers in fish-like vertebrates and fish. *Journal of Ichthyology*, 20(3): 1-38.
- Weitzman S H, Palmer L. 1997. A new species of *Hyphessobrycon* (Teleostei: Characidae) from Neblina region of Venezuela and Brazil, with comments on the putative 'rosy tetra clade'. *Neotropical Ichthyology*, 7(3): 209-242.
- Westerfield M. 2007. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish *Danio (Brachydanio) rerio**. 5th ed. Eugene: University of Oregon Press, 200.
- 耿波, 孙效文. 2008. 流式细胞术在水生生物 DNA 含量和倍性分析中的应用. *水产学杂志*, 21(2): 21-24.
- 林义浩. 1982. 快速获得大量鱼肾细胞中期分裂相的 PHA 体内注射法. *水产学报*, 6(3): 201-204.
- 楼允东. 1997. 中国鱼类染色体组型研究的进展. *水产学报* (增刊 1): 82-96.
- 宋立民, 王卫民, 王美玉. 2011. 鱼类混合胚胎染色体标本的一种制备方法. *水产科技情报*, (5): 252-253.
- 余先觉, 周曦, 李渝成, 等. 1989. *中国淡水鱼类染色体*. 北京: 科学出版社, 84.