

利用流式细胞计进行虾类倍性检测的研究*

周岭华 邓 田 张晓军 于奎杰 相建海

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 在生物有机体中,一个细胞核中所含的 DNA 总量对于某种类有机体是一定的。利用流式细胞计测量细胞中的 DNA 含量,可以用来鉴别有机体的倍性。本文首次报道了用流式细胞计测定中国对虾(*Penaeus chinensis*)、日本对虾(*P. japonicus*)和刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)倍性的结果。

关键词 流式细胞计, 虾, 倍性检测

在生物有机体中,一个细胞核中所含的 DNA 总量(称为2C或2倍体的DNA总量)对于某种类的有机体是一定的。不同种的细胞核中含有不同量的DNA,例如:人的每个细胞核中含有大约6 pg的DNA,鸡的每个细胞核中含有2.5 pg DNA。在动物界,除配子含有1C DNA及细胞分裂中某一短时间含2C~4C外,一个有机体中,所有的正常细胞都含相同数量的DNA,所以,利用仪器测量细胞中的DNA的含量,可以用来鉴别有机体的倍性。

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。Allen1983年, Aldridge1990年, Ewing1991年等,报道了用流式细胞计检测鱼类和贝类染色体倍性。对于虾类的检测,未见报道。近几年

* 国家攀登计划B项目资助PDB-6-5-1号;国家“八六三”资助项目863-819-01-05号;中国科学院海洋研究所调查研究报告第3655号。

收稿日期:1998-12-11;修回日期:1998-12-31

来,作者结合对虾多倍体的诱导工作,进行了这方面的研究,其目的是在多倍体的研究工作中,能准确、及时、快速、早期地检测诱导结果。本文首次报道了利用流式细胞计对中国对虾、日本对虾和刀额新对虾倍性检测的结果。

1 工作原理

将虾类细胞制备成单个细胞的悬液,经荧光染料染色后放入样品管中,在气体的压力下进入流动室,在流动室中,细胞排成单列,一个跟随一个地在鞘液包围下喷出,成为细胞液柱。液柱与入射的激光束相交,通过激光光斑的细胞,其染料被激发而产生特异性荧光。荧光染料与细胞 DNA 具有特异性结合,且 DNA 含量的多少与荧光染料的结合基本成正比,因此,可以测定荧光强度。由于代表荧光强度的“道数”与细胞 DNA 的含量成正比,因此,可以根据所测的 DNA 相对含量,确定一个种或一个群体的倍性。

2 材料与方 法

2.1 材料来源

二倍体中国对虾取自山东省青岛市沿海,二倍体日本对虾和刀额新对虾取自福建省厦门市沿海,多倍体的中国对虾,日本对虾和刀额新对虾于1998年4~8月,在中国科学院海洋研究所水族楼养殖室由人工诱导产生。

2.2 成体虾样品的制备

取少量的新鲜的活体组织,如鳃、附肢、肝脏等,放在胚胎皿中,加入0.5~0.6 ml的分散剂,用洁净的玻璃棒均匀地将组织磨碎,制成新鲜的、单个的细胞悬液,轻轻地用吸管将悬浮液吸到1 ml的离心管中自然沉淀。将未经破碎的细胞块自然沉淀于管底。吸取上层的悬浮液,用150~250 μm 的绢筛过滤,将滤液放在样品管中,用浓度为2 mg/L的DAPI染液进行染色,滤液与DAPI染液的体积比为1:5,样品细胞的最终浓度为 10^6 个/ml。

2.3 无节幼体样品的制备

利用无节幼体的趋光性,将幼体集中在养殖池的表面,收集30~50个洁净的幼体,用300 μm 的绢筛将海水过滤后,放在盛有0.4~0.6 ml分散剂的胚胎皿中,用玻璃棒均匀捣碎,制成新鲜的、单个细胞的悬浮液。悬液经150~250 μm 的绢筛过滤后,将滤液吸到样品管中,用浓度为2 mg/L的DAPI染液进行染色,滤液与DAPI染液的体积比为1:6,样品细胞的最终

浓度为 10^6 个/ml。

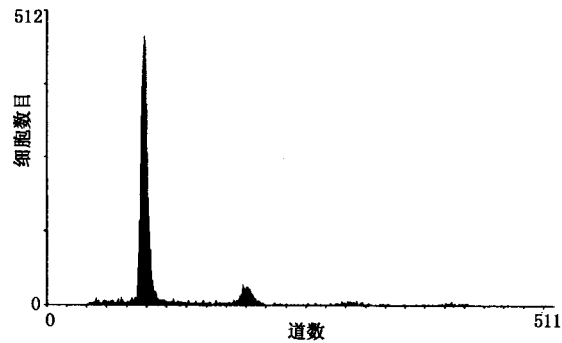


图1 二倍体中国对虾 DNA 相对含量

Fig. 1 Histogram of DNA relative content in diploid shrimp *Penaeus chinensis*

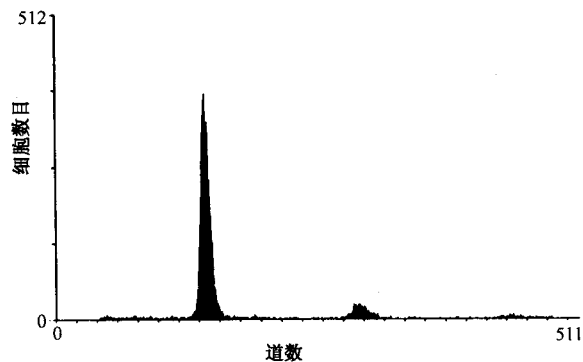


图2 三倍体中国对虾 DNA 相对含量

Fig. 2 Histogram of DNA relative content in triploid shrimp *P. chinensis*

2.4 样品分析

用西德 Partec CCA II 型流式细胞计进行标本分析,具体步骤是:使用 Partec 公司所提供的标准液,检测仪器的液流、电子和光学系统的稳定性,校正仪器的变异系数(CV 值),使 CV 值小于2.0%。取正常的同种二倍体虾的体细胞单细胞悬浮液,用同样的方法进行样品制备,采用同步染色,所得直方图作为内标准。

测定过程中,各项指标为:被测溶液的细胞浓度: 10^6 个/ml;被测样品细胞总数:5 000~20 000个;增益值:540.0;最低信号线(L-L):70;最高信号线(U-L):999;变异系数<3.0%。

液流速度可随时调整,使每秒通过的细胞数维持

在100~150个/s。

2.5 数据处理

检测结果以 DNA 直方图表示。图中,横座标表示荧光强度的相对值,即每个细胞中 DNA 的相对含量,以专用单位“道数”表示;纵座标表示某一 DNA 含量的细胞数目。在用流式细胞计进行细胞 DNA 含量的检测中,并不进行染色体计数,而只是测定 DNA 总含量的相对值。

应用 WINMID 软件,将获得的数据进行计算机处理。

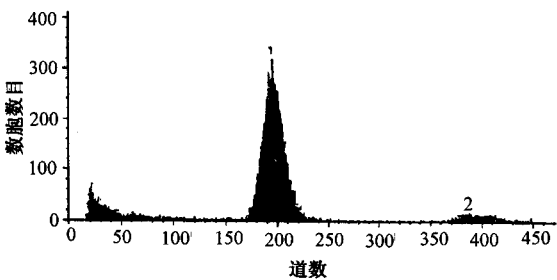


图3 四倍体中国对虾 DNA 相对含量

Fig. 3 Histogram of DNA relative content in tetraploid shrimp *P. chinensis*

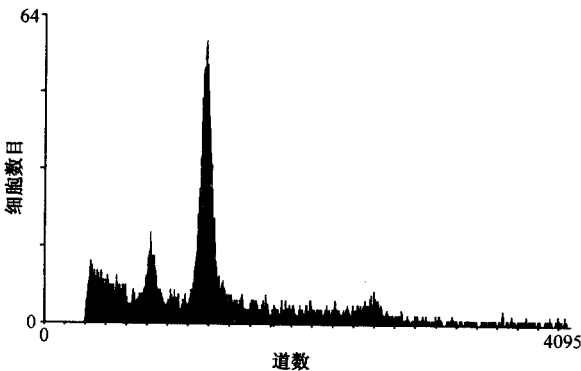


图4 诱导三倍体中国对虾的 DNA 相对含量

Fig. 4 Histogram of DNA relative content of inducing triploid shrimp *P. chinensis*.

3 结果

作者获得了二倍体中国对虾、日本对虾和刀额新对虾的 DNA 直方图,并以此为参照标准,获得了这3

种虾的三倍体、四倍体虾 DNA 相对含量直方图(图1~8)。

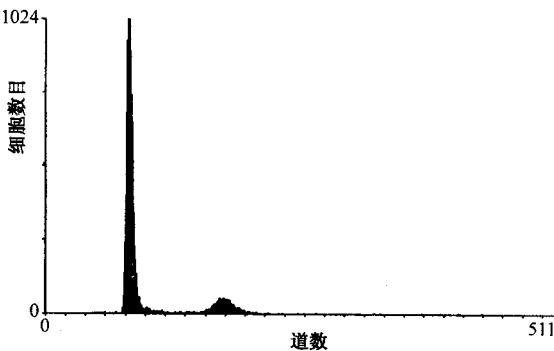


图5 二倍体日本对虾 DNA 相对含量

Fig. 5 Histogram of DNA relative content in diploid shrimp *Penaeus japonicus*

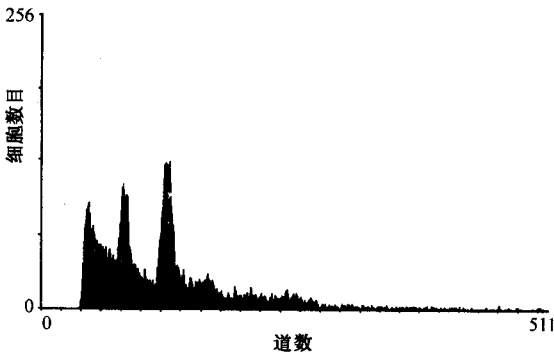


图6 诱导三倍体日本对虾的 DNA 相对含量

Fig. 6 Histogram of DNA relative content of inducing triploid shrimp *P. japonicus*

4 讨论

4.1 倍性的分析

在流式细胞计中进行细胞 DNA 含量的检测中,只是测量 DNA 的相对含量,这样,用流式细胞计做倍性分析,就必须把未知的细胞种群的 DNA 总量与已知的二倍体标准的细胞种群的 DNA 含量相比较,如果 DNA 总量与对照样不同,则未知的标本就可能是单倍体,三倍体、四倍体或非整倍体,利用这种方法,可以以最快的速度,在虾类发育的早期检测多倍体诱导结果,而且从胚胎、无节幼体、溞状幼体、糠虾幼体、稚虾及成虾都能进行,可以进行跟踪研究。是多倍体

海洋科学

研究中关键的技术。

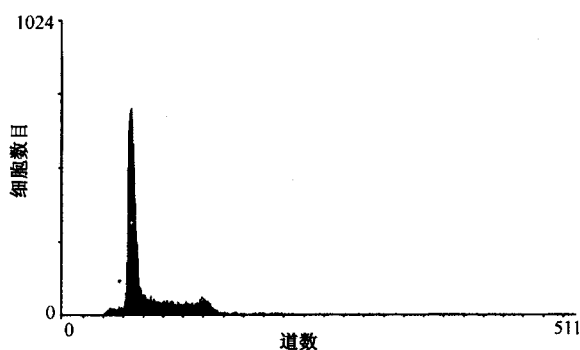


图7 二倍体刀额新对虾 DNA 相对含量

Fig. 7 Histogram of DNA relative content in diploid shrimp *Melapenaeus ensis*

4.2 样品的处理方法对直方图的影响

目前,样品标本处理的方法有:石蜡包埋活体组织、70 %乙醇固定细胞及取新鲜或冷冻的样品。

用石蜡包埋活体组织仅仅能产生少量的单个细胞的悬浮液,所得到的 DNA 直方图有比较宽的峰,即有较高的变异系数。

作者实验了用70 %的冷乙醇常规固定细胞,PBS洗二次,将离心洗过的细胞悬液在浓度为2 mg/L 的 DAPI 染色液中染色30 min,进行 DNA 测定,获得了较好的直方图,但此方法比较繁琐。

假如解剖的新鲜组织,在20 min 内不能被分析,那么,在将新鲜组织制成单个细胞的悬浮液以后,可以在-70 ℃条件下进行冷冻保存,为了更好地保护细胞,应加入适量的冷冻介质 DMSO,对悬浮细胞有很好的保护作用。

以上两种方法都得到了较好的 DNA 直方图,相

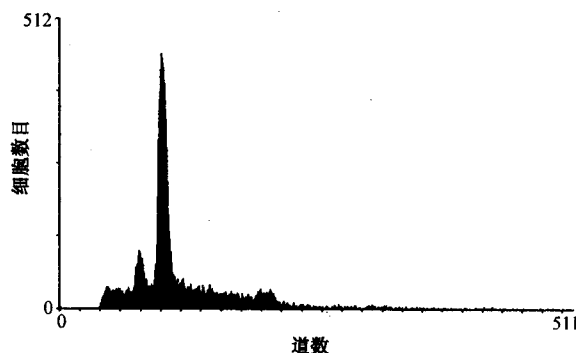


图8 诱导三倍体刀额新对虾的 DNA 相对含量

Fig. 8 Histogram of DNA relative content of inducing triploid shrimp *M. ensis*

比而言,新鲜的、未经固定的标本比用乙醇和石蜡固定的更好,在大多数情况下,能够获得高质量的单个的细胞悬浮液,在 DNA 直方图上,其 CV 值小于3.0 %。

4.3 关于碎片

样品的碎片杂质过多,会影响 DNA 的测定,如所测细胞占20 %以下,则直方图无效。在制备单细胞悬液过程中,作者采用了剪碎、研磨的机械方法,对细胞的损伤大,产生的细胞碎块多,因此,在操作过程中,要掌握好剪细、磨匀的方法,减少测量中的误差。

参考文献

- 1 左连富.流式细胞术与生物医学.辽宁:辽宁科技出版社,1996.1~433
- 2 Parikh PM, et al. . *Indian J. Med. Res.* , 1995, 102:24~27

DETECTION OF PLOIDY IN SHRIMP BY FLOW CYTOMETRY

ZHOU Ling-hua DENG Tian ZHANG Xiao-jun YU Kui-jie XIANG Jian-hai

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Dec. 11, 1998

Key words: Flow cytometry, Shrimp, Ploidy detection

Abstracts

The amount of DNA in the nucleus of a cell is specific to the type of organism. It can be used to identify the ploidy of organism to measure the DNA relative content of cells by flow cytometry. This paper report the results of ploidy de-

tection of shrimps *Penaeus chinensis*, *P. japonicus* and *Metapenaeus ensis* by flow cytometry.