

双壳类贝类活体倍性快速检测技术*

RAPID LIVING DETERMINATION OF SHELLFISH PLOIDY USING FLOW CYTOMETRY

巩 宁¹ 宋 坚¹ 丁 君¹ 张国范^{1,2}

(¹ 大连水产学院农业部海水增养殖生态学重点开放实验室 116023)

(² 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

关键词 双壳类贝类, 倍性快速检测, 流式细胞仪, DAPI

双壳类多倍体技术在细胞-染色体育种技术体系中占有重要地位,而倍性的鉴定是多倍体育种中的一个重要环节。以往人们主要用细胞染色体计数技术进行倍性的检测^[1]。但该技术操作复杂,技术要求高且不稳定,耗时长,而且在大多情况下还要杀死取样对象或对其造成较大的生理伤害。由于在杂交多倍体育种中四倍体的珍贵性,需要保持其健康存活状态。因此,其快速的活体倍性检测技术的重要性尤显突出。Allen等1983年用流式细胞法(Flow Cytometry)测定了经人工三倍体诱导的鱼类和贝类的倍性,取得了较好的结果。周岭华等^[2]报道了用流式细胞仪检测虾类倍性的结果。

本研究将流式细胞仪用于海洋双壳贝类长牡蛎 *Cnssostrea gigas* 的快速活体倍性检测,取得了较好的结果,为开展进一步的四倍体研究和应用奠定了必要的基础。

1 材料和方法

1.1 材料来源

本研究所用长牡蛎取自大连开发区大孤山海区人工养殖群体,该牡蛎1998年用6-DMAP进行了三倍体诱导处理。

1.2 仪器

PAS-III流式细胞仪;SK1 Vortex。

1.3 方法

1.3.1 样本的获得 牡蛎干露30~60 min,放入5%~7% MgSO₄海水中,投入少量单胞藻,微量充气,牡蛎间避免互相挤压。经过3~9 h,牡蛎开壳。用经70%酒精消毒过的眼科剪刀剪取1~3 mm³的鳃组

织,加入1.5~2.5 ml DAPI染液,于冰箱中-20℃保存待测。

1.3.2 倍性分析 将样品在Vortex上振荡1~3 min,得到单个细胞悬浮液,经30 μm筛网过滤至样品管中,上机测定。各项指标为:Gain值657.5,Speed 2~4,通过的细胞数的50~150个/s,被测样品细胞总数5 000~10 000个。

2 结果与讨论

长牡蛎是较早进行多倍体诱导操作的一种双壳类。以往在进行倍性检测时采取的打孔取样法,操作复杂,要求高,对贝类损伤大,孔不易愈合,影响贝类生长和发育。作者采取硫酸镁浸泡法,使其自然开壳,取样后立即将牡蛎放回养殖海水中,牡蛎很快即能正常开启双壳进行摄食。该方法操作快捷方便,对实验牡蛎的损伤小,效率高。

贝类开壳的原因是硫酸镁使贝类闭壳肌麻痹,不能维持闭壳状态。用不同浓度的硫酸镁对牡蛎进行浸泡,在25℃时5%和7%的硫酸镁效果较好,在9 h时开壳率分别达到90%和84%。3%的硫酸镁可使其开壳,但麻痹程度不够,触碰贝类后贝壳又关闭。9%浓度的硫酸镁在相同时间内开壳率不如5%和7%的高(表1)。取样后,将牡蛎放回养殖海水,3~10 min内即可闭壳。

* 本研究为863-819主题研究的部分内容。

本文的实验设计得到了中科院海洋所阙华勇博士的大力协助,在此表示衷心感谢。

收稿日期:2000-01-25;修回日期:2000-04-18

表 1 硫酸镁浓度及浸泡时间对牡蛎开壳率的影响
(25 ℃)

浸泡时间 (h)	开壳率(%)			
	硫酸镁浓度(%)			
	3	5	7	9
3	15	45	47	30
5	15	55	47	30
7	30	75	68	50
9	45	90	84	70
11	55	95	89	80

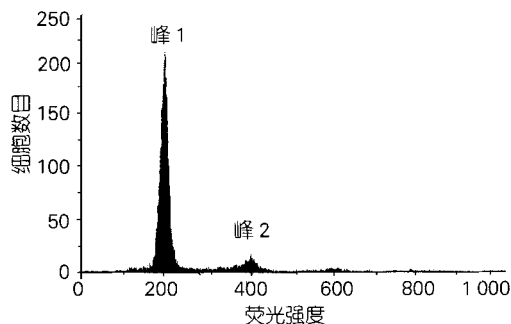


图 1 二倍体长牡蛎 DNA 相对含量

流式细胞术是 19 世纪 70 年代发展起来的一种能快速测量细胞的物理化学性质,并可对其分类收集的高技术。它可对悬液中的细胞及颗粒性物质进行快速测量,悬浮在液体中的分散细胞一个个地依次通过检测区,每个细胞通过测量区时产生电信号,这些信号可以代表荧光、散射光、光吸收或细胞的阻抗等,反映了细胞的一系列重要的物理特性和生化特性^[1]。流式细胞仪倍性检测法是用对 DNA、RNA 具有特异性的荧光染料对细胞核进行染色。细胞解离制成悬液后,用激光激发,然后通过细胞荧光分析仪的光敏区,其荧光强度就会被显示出来。荧光强度与细胞的 DNA 含量成正比,可以反映出被测细胞群体的相对 DNA 含量。与染色体计数法相比,流式细胞技术是一种简

单、快速的检测方法。它取样量少,不必杀死被测动物,对多倍体诱导来说,可以得到已知倍性的活体生物^[2]。

用流式细胞仪做倍性分析,必须用已知 DNA 含量的细胞群体做参照。在实验中,作者用二倍体长牡蛎做标准,理想的三倍体细胞中 DNA 含量是二倍体的 1.5 倍。测定的结果以直方图的形式表示。图 1 和图 2 分别表示二倍体和三倍体长牡蛎 DNA 相对含量。图中的 X 轴代表荧光强度, Y 轴代表细胞数目。从图中可以看到,各直方图中均有两个峰。其中一个荧光值低,细胞数多。另一个荧光值约是前一个的两倍,细胞数较少。这两个峰分别表示有丝分裂 G₀~G₁ 期(峰 1 和峰 3)和 G₂~M 期(峰 2 和峰 4)的细胞。比较二倍体和三倍体的倍性,只比较 G₀~G₁ 期细胞(峰 1 和峰 3),三倍体的 DNA 含量约是二倍体的 1.5 倍。

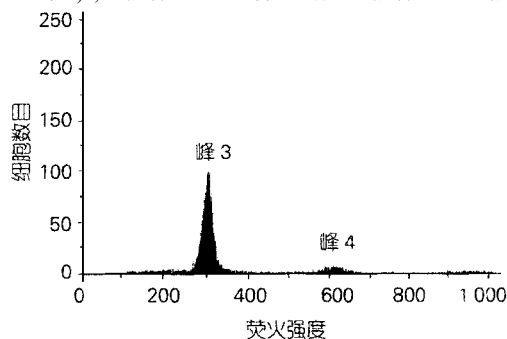


图 2 三倍体长牡蛎 DNA 相对含量

在实验中还发现,样品中杂质过多,会影响 DNA 的测定。新鲜的样品比冷冻后的样品测定效果好。在细胞数足够的条件下,进样的速度影响峰值的宽度。

参考文献

- 1 李楠等. 荧光探针应用技术. 北京: 军事医学科学出版社. 1998: 134~140
- 2 李斌等. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(3): 453~456
- 3 周岭华等. 海洋科学: 1999, 2: 42~45
- 4 Zhang Guofan, Chang Yaqing et al.. J. Oceanol. Limnol. 1998, 16(3): 249~255 (本文编辑: 李本川)