

乐清湾泥蚶血细胞周期和 DNA 含量*

吴洪喜¹ 柴雪良¹ 吴建波² 沈志坚²

(¹浙江省海洋水产养殖研究所 温州 325005)

(²温州医学院附属第一医院医科所 325011)

摘要 用流式细胞仪测定乐清湾泥蚶血细胞 DNA 含量,得出组方图中只有一个峰(G₀/G₁),表明了乐清湾泥蚶血液不存在合成期(S)、合成后期(G₂)和分裂期(M)细胞。血细胞已失去分裂功能,不存在周期现象。以小鸡血细胞做标准对照物(DNA 含量以 2.3 pg/N),测得乐清湾泥蚶血细胞 DNA 含量为 3.08 pg/N。

关键词 乐清湾,泥蚶,血细胞周期,DNA 含量,流式细胞仪

DNA (脱氧核糖核酸)是绝大多数生物的遗传物质。染色体或染色质作为 DNA 的载体,它承担着对 DNA 的贮存、复制、传递及控制基因的活动,调节基因表达等一系列重大生物学功能。由于大多数生物体细胞中所含的染色体数目和形态稳定,DNA 含量恒定,所以 DNA 含量已成为物种研究的主要内容之一。目前,该技术已被水产界用来测定某些鱼、虾、贝类的 DNA 含量^[1,2,6]、细胞周期、染色体倍性^[3]的研究和分析,但未见有关泥蚶 *Tegillarca gmnosa* (Linnaeus) 的研究。本文报道了乐清湾泥蚶血细胞周期和 DNA 含量的研究结果,以期为贝类的细胞遗传学和遗传改良研究提供理论依据。

1 分析原理

荧光染料易与细胞 DNA 结合,且结合量与 DNA 含量成正比。泥蚶血细胞经染色后放在样品管中,在气体压力的作用下进入流动室,在流动室中,细胞排成系列,一个跟一个地在鞘液包围中喷出成为细胞液柱。液柱与入射的激光束相交,通过激光光斑的细胞,其染料被激发产生荧光,荧光强度与细胞 DNA 含量也成正比,根据该原理,就可测得各种生物的相对 DNA 含量^[3,4]。由于细胞在分裂过程中各期的 DNA 含量是不同的,所以根据测得的 DNA 含量,就可以分析细胞周期。处于分裂间期或分裂前期细胞的 DNA 含量是较稳定的,是通常所指的某生物(2C)的 DNA 含量^[5]。因此,在同一条件下测定某生物细胞 DNA 的荧光强度与一已知 DNA 含量的标准对照物细胞 DNA 的荧光强度,就可求得该期细胞 DNA 的绝对含量。

2 材料与方法

2.1 血样的制备

取浙江省乐清湾泥蚶若干,冲洗干净,在海水中暂养 1 d 以上,选择目测健康,壳长 25 mm 以上的个体 10 个,打开贝壳,分别用小型注射器采血 0.2~0.5 ml,用卡诺尔溶液固定 30 min 后待检。

2.2 标准对照物的制备

取小鸡 (*Gallus domestica*) 1 只,用事先已加抗凝剂的注射器于翅膀动脉处采血若干,用卡诺氏固定液固定后备用。

2.3 样品的染色

将已制备好的泥蚶血和鸡血用碘化丙锭试剂 (Propidium iodide) 在 4 °C 避光条件下染色,时间 20 min。

2.4 测定和计算

将已染色的泥蚶血样和标准小鸡血样在流式细胞仪上测定荧光强度。由于细胞 DNA 含量与荧光强度成正比,泥蚶血细胞荧光强度与鸡血细胞的荧光强度之比等同于泥蚶血细胞的 DNA 含量与标准小鸡血细胞的 DNA 含量之比,根据 Swan 1971 年报道的标准小鸡血细胞的 DNA 含量(2.3 pg/N),求出泥蚶血细胞

* 温州市重点科研项目 S9903154 号。

第一作者:吴洪喜,出生于 1963 年,高级工程师,主要从事水产动物发育和生殖学研究。

收稿日期:2001-04-13;修回日期:2001-05-29

的 DNA 含量。

2.5 流式细胞仪

FASCa Libur, 美国 BD 公司生产。工作条件: 氩离子激光功率 15 mW, 波长 490 nm; 计算机数据处理软件: Mdi Fit LT2.0 (PMc)。

3 结果与讨论

3.1 泥蚶血细胞的周期

图 1 是泥蚶血细胞 DNA 含量组方图, 可见, 泥蚶血细胞荧光值分布只有一个 (G_0/G_1) 峰, 不存在合成期 (S)、合成后期 (G_2) 和分裂期 (M) 细胞。一般来说, 在生命活动中, 生物细胞总是不断地进行生长和分裂, 这个过程具有周期性, 称为细胞周期。它包括: 分裂期 (M) 和分裂间期。分裂期是指两次细胞分裂之间的时间, 根据 DNA 的合成可分为 3 个时期: 即合成前期 (G_1)、合成期 (S)、合成后期 (G_2)。已经分化了的细胞通常不再进行分裂, 只执行特殊功能, 这个时期称为 G_0 期。因此, 在细胞周期中, 不同时期细胞的 DNA 含量是不同的。 G_0 和 G_1 期细胞的 DNA 含量较稳定, 是通常所指的某生物 (2C) 的 DNA 含量; G_2 和 M 期细胞, 由于 DNA 已经合成完毕, 而细胞尚未完全一分为二, 是通常所指的某生物 (2C) 的 DNA 含量, DNA 含量是 G_0 和 G_2 的两倍; S 期细胞由于 DNA 尚在合成之中, 其 DNA 含量不定, 处于前二者之间。根据作者的测定结果, 泥蚶血细胞 DNA 的荧光值只有一个峰 (G_0/G_1), 这说明了泥蚶血细胞 DNA 含量相当一致, 不存在上述提及的不同 DNA 含量的细胞群。可见, 泥蚶血细胞不具有分裂功能, 无细胞周期现象。

3.2 泥蚶血细胞的 DNA 含量

表 1 乐清湾泥蚶血细胞的 DNA 含量

Tab.1 The DNA contents of blood cell of *Tegillarca granosa* (Linnaeus) in Yueqing Bay

样品	测定细胞数 (个)	泥蚶血细胞 荧光值 (道)	蚶鸡血细胞 荧光值比	泥蚶血细胞 DNA 含量	泥蚶血细胞 DNA 含量均值
1	1 663	47.29	1.33	3.06	
2	969	47.29	1.33	3.06	
3	753	47.36	1.33	3.06	
4	2 222	47.84	1.34	3.08	
5	1 202	48.49	1.36	3.13	3.08 pg/N
6	4 183	46.32	1.30	2.99	
7	2 670	48.52	1.36	3.13	
8	817	47.95	1.35	3.11	
9	3 174	49.92	1.40	3.22	
10	789	46.68	1.31	3.01	

注: 以小鸡血细胞 DNA 含量为 2.3 pg/N, 鸡血细胞荧光值为 35.65 道计。

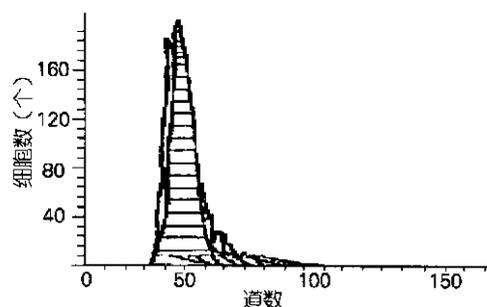


图 1 乐清湾泥蚶血细胞 DNA 含量组方

Fig.1 DNA histogram of blood cell contents of *Tegillarca granosa* (Linnaeus) in Yueqing Bay

对 10 个泥蚶血细胞样品和标准小鸡血细胞的 DNA 的荧光测定和 DNA 绝对含量计算结果 (见表 1) 表明: 10 个泥蚶血细胞样品的 DNA 含量十分接近, 平均值为 3.08 pg/N。事实上, 在一个细胞中, 除细胞核包含 DNA 外, 线粒体中也含 DNA, 植物叶绿体也含 DNA。用流式细胞仪测得的 DNA 含量是细胞中的所有 DNA 的总含量, 但除细胞核 DNA 外, 其他的, 如线粒体 DNA, 叶绿体 DNA 的含量微乎其微, 可忽略不计。因此, 本文测定方法按照国际惯例仍称为细胞 DNA 含量。Hinegardner 1974 年, Leyma. H. 1991 年、1994 年、1996 年, 对贝类 DNA 含量的研究已有过报道, 但测定的材料多为肌肉或鳃组织。一般来说, 同一物种的不同组织其 DNA 含量是恒定的^[6], 但李贇等^[1]分别对太平洋牡蛎的闭壳肌、鳃组织和性腺组织进行了 DNA 含量测定, 结果表明: 肌肉和鳃组织的 DNA 含量比较一致, 性腺组织的 DNA 含量受牡蛎不同生长环境影响较大, 尤其是水温。

认为: 利用核 DNA 含量的测定结果进行成体牡蛎倍性鉴定时, 鳃及闭壳肌组织是适宜的材料。但将测试材料制备成单细胞悬浮液就较烦琐; 而利用贝类血细胞测定 DNA 含量就比较方便, 因为血细胞本身就是游离的单体。

参考文献

- 1 李贇、郑晓东、王昭萍等。牡蛎不同组织细胞核 DNA 含量比较, 青岛海洋大学学报, 1999, 29(3): 453 ~ 456
- 2 吴洪喜、柴雪良、吴建波等。三种蚶的 DNA 含量和种间亲缘关系的探讨, 水产科技情报, 2000,

研究报告 *REPORTS*

- 2: 51 ~ 53
- 3 周岭华,邓 田,张晓军等.利用流式细胞计进行虾类倍性检测的研究,海洋科学,1999,23(2): 42 ~ 46
- 4 宋平根,李素文.流式细胞仪的原理和应用.北京:北京师范大学出版社,1992.
- 5 刘祖洞,江绍慧.遗传学(下册).北京:高等教育出版社,1979. 69 ~ 78
- 6 Owens, L., Ó Neill, A.. Use of a clinical cell flow cytometer of differential counts of *Paraeis monodon haemocytetes*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 1997, 31(2): 147 ~ 151

辅助参考文献

范兆廷,尹洪滨,宋苏祥等.四种鱼类外周血红细胞细胞周期及 DNA 含量,动物学报,1995,41(4): 370 ~ 374

THE BLOOD CELL CYCLES AND DNA CONTENT OF *Te-gillarca granosa* IN YUEQING BAY

WU Hong-xi¹ CHAI Xue-liang¹ WU Jian-bo² SHEN Zhi-jian²

(¹ Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005)

(² Medicine Science Institute of 1st Affiliated Hospital, Wenzhou Edicine College, Wenzhou 325011)

Received: Apr., 13, 2001

Key Words: Yueqing Bay, *Te-gillarca gmnosa* Blood cell cycles, DNA content, Flow cytometer

Abstract

The blood cells were used to determine the relative nuclear DNA content by flow cytometry, which indicated that there was only one peak value in the histogram of cell nuclear DNA content of *Te-gillarca gmnosa* in Yueqing Bay. The result suggests that the blood cell of *Te-gillarca gmnosa* in Yueqing Bay has no cell cycles and the cell division. Using chicken cell blood cell as a standard reference (Its DNA content is 2.33 pg/ nucleus, the DNA content of *Te-gillarca gmnosa* in Yueqing Bay was calculated to be 3.08 pg/ N).

(本文编辑:李本川)