

邹芝英,肖 炜,李大宇,等. 吉富罗非鱼核 DNA 含量的测定[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):36-38.

吉富罗非鱼核 DNA 含量的测定

邹芝英,肖 炜,李大宇,徐 跑,祝璟琳,韩 珏,乐贻荣,杨 弘

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室,江苏无锡 214081)

摘要:以吉富罗非鱼的外周血细胞为样本、小鼠淋巴细胞 DNA 为标准(7.0 pg/2C),采用流式细胞术结合内标法测定血细胞的核 DNA 含量。结果显示:吉富罗非鱼的核 DNA 含量为小鼠淋巴细胞的 $0.339\ 2 \pm 0.009\ 0$ 倍,绝对含量为 $(2.374\ 5 \pm 0.063\ 0)$ pg/2C。

关键词:吉富罗非鱼;流式细胞术;DNA 含量

中图分类号: S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0036-03

罗非鱼(*Tilapia*),俗称非洲鲫鱼,以其生长快、食性杂和适应性强等优势成为国际上养殖最广泛的品种之一,是国际贸易第三大水产品。中国的罗非鱼产量占全球总产量的一半,其出口量高居世界第一位^[1]。吉富品系尼罗罗非鱼(genetically improved farmed *Tilapia Oreochromis niloticus*, GIFT,简称吉富罗非鱼)是中国主要养殖的罗非鱼品种(系)之一,也是中国养殖的罗非鱼品种中生长最快的品种(系)之一。吉富罗非鱼是由国际水生生物资源管理中心、挪威水产

养殖研究所和菲律宾的一些国家级研究机构通过对 4 个非洲原产地(埃及、加纳、肯尼亚、塞内加尔)直接引进的尼罗罗非鱼品系和 4 个在亚洲地区(以色列、新加坡、泰国、中国台湾)广泛养殖的尼罗罗非鱼品系进行混合选育进而获得的优良品系^[2]。经过近 20 年的种内群体间杂交和选育,该品系已经显示出优越的生长优势和潜能^[3-4],引起了亚太地区的广泛兴趣和关注,多个国家进行了引种并启动了对其进一步改良和推广的国家育种计划^[5]。为了促进中国罗非鱼养殖持续稳定的发展,2006 年 8 月世界渔业中心向中国水产科学研究院淡水渔业研究中心输送了 60 个家系的吉富罗非鱼,以期在中国进行吉富罗非鱼的选育和推广工作,这是中国第一次引进如此多家系的吉富罗非鱼。目前研究人员已经对该群体进行了连续 3 代的家系选育,同时开展了对不同家系的生长性能^[6-7]、遗传多样性^[8-9]等方面的评估工作。

脱氧核糖核酸(DNA)是绝大多数生物体内的遗传物质,一个细胞核中所含的 DNA 总量对于某物种是一定的。生物 DNA 含量的研究不但是研究物种间差别的重要方法,而且对

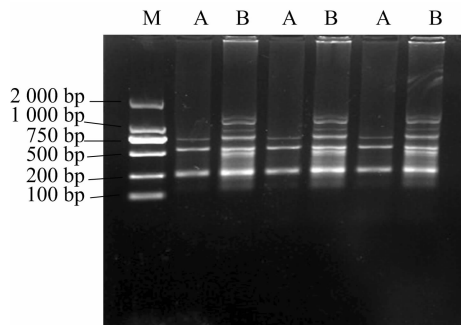
收稿日期:2013-08-23

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(编号:CARS-49);

中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(编号:2011JBFA04);现代农业人才支撑计划;罗非鱼物种资源保护项目;作者简介:邹芝英(1980—),女,江苏无锡人,硕士,助理研究员,主要从事水产动物遗传育种与分子生物学研究。Tel:(0510)85559009;E-mail:zouzy@ffrc.cn。

通信作者:杨 弘,研究员,主要从事鱼类育种研究。Tel:(0510)85550252;E-mail:yangh@ffrc.cn。

泳道均为番茄根部的南方根结线虫,而引物 841 能将二者鉴别开来。



M—DL2000; A寄主为黄瓜; B寄主为番茄

图2 引物841对不同寄主上南方根结线虫的鉴别结果

3 讨论

一直以来,会阴花纹在鉴定根结线虫的种的效果方面是值得肯定的;但是,很多研究显示,会阴花纹存在较大的变异性,而 ISSR-PCR 能够帮助弥补会阴花纹变异所带来的鉴定

局限性。与此同时,南方根结线虫具有 4 个生理小种,也有可能不同的寄主上寄生的是不同的生理小种。而本次试验采集黄瓜和番茄根部样品的季节不同,黄瓜是在冬季蔬菜温棚中采集的根部样本,而番茄却是在 7 月份的露天大田里采集的根部样本,所以,笔者推断 ISSR-PCR 结果之所以有差异性,可能是不同的生理小种造成的。以往对南方根结线虫生理小种的鉴别依据是鉴别寄主,本试验结果提示以后可以考虑利用 ISSR-PCR 鉴别南方根结线虫的生理小种;并且本试验结果也可作为今后宁夏地区根结线虫病害的防治提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 黄 利,王 宇,董林林,等. 南方根结线虫与秀丽线虫同源基因的鉴定及其应用分析[J]. 中国农业大学学报,2010,15(4): 45-50.
- [2] 廖金铃,蒋 寒,孙龙华,等. 中国南方地区作物根结线虫种和小种的鉴定[J]. 华中农业大学学报,2003,22(6):544-548.
- [3] 思彬彬,张靠稳,孟北乾. 雌根结线虫 DNA 的提取方法[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):27-28.

分类和系统演化的探讨、物种进化研究等具有参考意义,同时也是种质资源和种质质量的主要指标之一。本试验对我国新引进的吉富罗非鱼群体中的 DNA 含量进行测定,以期为吉富罗非鱼的人工选育和种质资源评价等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 试验用吉富罗非鱼取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴养殖基地,为同一批繁殖的苗种。将所有的鱼在重量为 20 g 左右时进行 PIT (passive integrated transponder) 标记,然后在同一池塘内养殖 300 d,再测定每尾鱼的体质量、体长、体高、体厚等,并计算 300 d 的增重。从试验用罗非鱼中随机抽取其 3 个家系 (A、B、C),A 家系 13 尾,B、C 家系各 15 尾,共 43 尾,分别记为 $A_1 \sim A_{13}$ 、 $B_1 \sim B_{15}$ 、 $C_1 \sim C_{15}$;其中雌鱼 20 尾,雄鱼 23 尾。试验用昆明种小白鼠由卫生部核医学重点实验室江苏省原子医学研究所惠赠。

1.1.2 仪器与试剂 FACSCalibur 流式细胞仪,BD 公司。碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 购自 Sigma 公司;RNase 购自 Sigma 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 单细胞悬液的制备及固定 取 4 周龄的昆明种小白鼠,断颈处死后剖腹,剪开胸骨,可见心脏上方灰白色柔软的组织块,即胸腺。分离周围组织,取下胸腺并用 PBS 清洗。轻压组织块得浑浊的液体,用 200 μm 细胞筛过滤,即得单细胞悬液。1 000 r/min 离心 15 min 后弃上清,加 PBS 缓冲液重悬沉淀物并计数。调整细胞浓度,使加入的预冷 100% 乙醇变为 70% 浓度时,淋巴细胞浓度调整为 10^6 个/mL。 -20°C 固定过夜或者冷藏待用。

从试验鱼尾静脉取约 0.5 mL 血 (用 ACD 抗凝剂湿润注射器,以防凝固),严防溶血。 4°C 静置过夜后用 PBS 缓冲液将鱼血稀释,清洗 1 次后重悬于 PBS 溶液中并用血细胞计数板计数。加入预冷的 70% 乙醇-PBS 混合液,并调整细胞浓度至 10^6 个/mL, -20°C 固定过夜或者冷藏待用。

1.2.2 PI 染色 分别取 0.5 mL 小鼠淋巴细胞固定液和鱼血固定液,混合、离心去除固定液后用 PBS 缓冲液清洗 1 次,重悬于 1 mL 的 PI-PBS (PI 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 染色液中,加入 2 μL 100 mg/ μL RNase,避光孵育 0.5 h 后过 200 μm 细胞筛,上机检测。

1.2.3 样品检测 采用 FACSCalibur 流式细胞仪测定各样品的荧光密度值 (PI fluorescence),流速控制在低速 (12 $\mu\text{L}/\text{min}$),每次检测 10 000 个细胞。由流式细胞仪自带的软件 CELLQuest Pro 自动计算每次检测样品的平均荧光密度值。

1.2.4 数据处理 每次检测样品的细胞核 DNA 含量依照以下公式计算: $P_1 = E_2/E_1 \times P_2$ 。式中: P_1 表示鱼血细胞的 DNA 含量,pg; P_2 表示对照小鼠细胞的 DNA 含量,pg; E_1 表示鱼血细胞的平均荧光密度值; E_2 表示鸡血细胞的平均荧光密度值。小鼠淋巴细胞的 DNA 绝对含量以 7.0 pg/2C 为标准^[10]。用流式细胞仪自带的软件 ModFit 软件分析细胞周期。所有试验数据均用 SPSS 10.0 进行统计分析,结果表示为“平均值 \pm 标准差”。

2 结果与分析

2.1 吉富罗非鱼的细胞周期

吉富罗非鱼细胞与小鼠淋巴细胞的荧光密度峰的相对位置见图 1。ModFit 软件分析表明,小鼠淋巴细胞的荧光密度峰 (M_2) 只有 1 个 G_0/G_1 峰,不表现出细胞周期现象;吉富罗非鱼的红细胞存在 2 个荧光密度峰,第 1 个峰值 (M_1) 约占 95% 左右,为 G_0/G_1 期细胞; G_0/G_1 峰值后是 1 段比例很小的峰谷,约占 3.5% 左右,为 S 期;紧接着又有 1 段峰值约为 2.5% 的 G_2 期和 M 期。

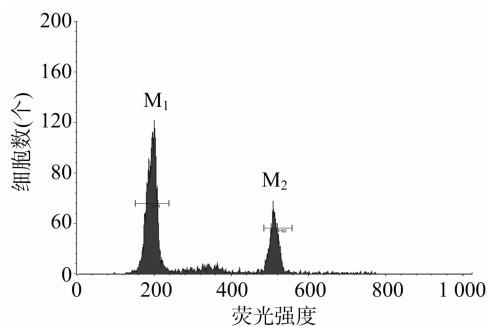


图1 吉富罗非鱼和小鼠淋巴细胞的DNA含量直方图

2.2 吉富罗非鱼的细胞核 DNA 含量

采用流式细胞仪对吉富罗非鱼的血细胞 DNA 含量进行了测定,详见图 1、表 1。可以看出吉富罗非鱼血细胞的平均荧光密度值为 200.33 ± 11.2602 ,小鼠淋巴细胞的平均荧光密度值为 590.50 ± 28.3029 ,两者比值 0.3392 ± 0.0090 。以小鼠淋巴细胞 DNA 的绝对含量值 7.0 pg/2C 作为标准,可以算出吉富罗非鱼的血细胞 DNA 绝对含量为 (2.3745 ± 0.0630) pg/2C。

3 讨论

研究鱼类的种质参数、掌握该鱼的种质特征对于人工育种都具有一定的指导意义。DNA 含量分析是种质标准中不可缺少的参数之一。近年来测定鱼类细胞 DNA 含量的方法主要是采用显微分光光度计和流式细胞仪 2 种方法^[11],从目前的技术水平来看,采用流式细胞仪测定鱼类 DNA 含量要比采用显微分光光度计法更准确些。流式细胞仪是 70 年代发展起来的一种利用流式细胞仪对细胞等生物粒子的理化及生物学特性 (细胞大小、DNA/RNA、细胞表面抗原表达等) 进行相关检测分析的高技术仪器,具有快速、准确、采集数据量大 (速度可达 1 000 ~ 10 000 个/s)、分析全面和操作简单等优点,目前已广泛运用于鱼类、虾类等 DNA 含量和倍性的检测中^[12-14]。到目前为止,用流式细胞仪测定鱼类细胞含量的方法已比较完善和普遍。此外,流式细胞仪对样品需求量少,只需要微量鱼血即可,使得对试验鱼的伤害减至最低。

对于同一种生物而言,体细胞的 DNA 含量是恒定的,具有种的特征,在亲缘关系相近的类群中可以作为探讨其演化地位和亲缘关系的依据^[13]。吴洪喜等测定得毛蚶 (*Scapharca subcrenata* Lischke) 与魁蚶 (*Scapharca broughtonii* Schrenck) 的 DNA 含量高度一致,表明两者之间的亲缘关系接近,但泥蚶

表 1 吉富罗非鱼血细胞的核 DNA 含量

试验鱼	吉富罗非鱼核 DNA 荧光值	小鼠淋巴细胞核 DNA 荧光值	比值	吉富罗非鱼核 DNA 含量 (pg/2C)
A ₁	200.19	578.99	0.345 8	2.420 3
A ₂	182.67	559.26	0.326 6	2.286 4
A ₃	189.63	579.07	0.327 5	2.292 3
A ₄	198.24	592.63	0.334 5	2.341 6
A ₅	190.40	554.12	0.343 6	2.405 3
A ₆	190.67	549.94	0.346 7	2.427 0
A ₇	190.77	565.32	0.337 5	2.362 2
A ₈	207.63	593.40	0.349 9	2.449 3
A ₉	200.31	587.92	0.340 7	2.385 0
A ₁₀	193.59	568.65	0.340 4	2.383 1
A ₁₁	199.93	578.07	0.345 9	2.421 0
A ₁₂	199.38	574.41	0.347 1	2.429 7
A ₁₃	204.08	593.86	0.343 7	2.405 6
B ₁	189.95	556.30	0.341 5	2.390 2
B ₂	198.98	588.28	0.338 2	2.367 7
B ₃	192.47	578.52	0.332 7	2.328 9
B ₄	190.07	572.90	0.331 8	2.322 4
B ₅	210.01	627.98	0.334 4	2.341 0
B ₆	197.23	592.58	0.332 8	2.329 8
B ₇	199.08	600.73	0.331 4	2.319 8
B ₈	221.60	620.75	0.357 0	2.498 9
B ₉	231.94	623.01	0.372 3	2.606 0
B ₁₀	201.21	580.49	0.346 6	2.426 3
B ₁₁	218.95	657.60	0.333 0	2.330 7
B ₁₂	179.23	546.27	0.328 1	2.296 7
B ₁₃	211.74	652.01	0.324 7	2.273 2
B ₁₄	219.68	642.94	0.341 7	2.391 8
B ₁₅	214.21	647.85	0.330 6	2.314 5
C ₁	213.56	637.44	0.335 0	2.345 2
C ₂	193.64	577.42	0.335 4	2.347 5
C ₃	196.21	584.45	0.335 7	2.350 0
C ₄	200.37	590.52	0.339 3	2.375 2
C ₅	197.19	564.79	0.349 1	2.444 0
C ₆	184.14	562.02	0.327 6	2.293 5
C ₇	186.66	561.45	0.332 5	2.327 2
C ₈	193.64	581.32	0.333 1	2.331 7
C ₉	194.96	584.45	0.333 6	2.335 1
C ₁₀	190.65	567.96	0.335 7	2.349 7
C ₁₁	210.96	610.36	0.345 6	2.419 4
C ₁₂	203.96	597.39	0.341 4	2.389 9
C ₁₃	209.59	609.89	0.343 7	2.405 6
C ₁₄	208.08	604.74	0.344 1	2.408 6
C ₁₅	206.61	593.54	0.348 1	2.436 7

(*Arca granosa*) 的 DNA 含量则稍高于毛蚶和魁蚶,因此认为泥蚶在进化程度上与毛蚶和魁蚶相近且比它们要高级^[14]。方旅平等研究发现,日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)与刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)DNA 含量的绝对值相差不大,因而推知这 2 种虾在系统发生上具有相近的亲缘关系,这与形态学上的分类系统是一致的^[15]。顾若波等研究发现,似刺鲃(*Paracanthobrama guichenoti* Bleeker)的细胞核 DNA 含量与同亚科的花鲈(*Hemibarbus maculatus* Bleeker)接近^[16]。本试验利用流式细胞术测得吉富罗非鱼血细胞核 DNA 含量为(2.374 5 ± 0.063 0) pg/2C,与已报道的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的(2.27 ± 0.07) pg/2C、奥利亚罗非鱼(*O. aureus*)的(2.22 ± 0.08) pg/2C^[17]和星洲红鱼(Red *Tilapia*)的(2.46 ± 0.09) pg/2C^[18]相近,这与 4 种罗非鱼亲缘关系接近是一致的。

常见的参照标准有鸡血细胞、人淋巴细胞、小鼠淋巴细胞、鳖血细胞、鲮鱼红细胞及鲑鱼红细胞等^[11]。鸡血细胞具有来源丰富、着色性好、大小均匀等优点,并且在大量研究中被广泛应用,而且鸡血细胞与罗非鱼的 DNA 含量相近,比值接近^[17]。采用内标法检测发现,吉富罗非鱼细胞与小鼠淋巴细胞的荧光密度峰值相近,不易区分,如果对照品和测试样品分别上机检测即采用外标法检测时,有可能出现一定的误差。许晓军等报道采用内标法获得的检测结果变异系数小于外标法,并建议选取 DNA 含量相差较大的物种作为参照标准^[19],因此本试验选取小鼠淋巴细胞作为对照标准,以内标法测定吉富罗非鱼的细胞核 DNA 含量。

参考文献:

[1] 杨 弘. 我国罗非鱼产业现状及产业技术体系建设[J]. 中国水产,2010(9):6-10.

[2] WorldFish Center. GIFT technology manual:an aid to Tilapia selective breeding[R]. Penang,Malaysia:World Fish Center,2004.

[3] 李思发,李晨虹,李家乐,等. 尼罗罗非鱼五品系生长性能评估[J]. 水产学报,1998,22(4):28-35.

[4] 李思发,李晨虹,李家乐,等. 尼罗罗非鱼选育三代效果评价[J]. 上海水产大学学报,2001,10(4):289-292.

[5] 李思发. 吉富品系尼罗罗非鱼引进史[J]. 中国水产,2001(10):52-53,62.

[6] 董在杰,何 杰,朱 健,等. 60 个家系吉富品系罗非鱼初期阶段的生长比较[J]. 淡水渔业,2008,38(3):32-34.

[7] 何 杰,徐 跑,董在杰,等. 吉富品系尼罗罗非鱼(GIFT)群体内的形态差异与分化[J]. 中国水产科学,2009,16(1):54-60.

[8] 董在杰,梁政远,刘介奇,等. 我国新引进吉富品系尼罗罗非鱼群体的遗传多样性分析[J]. 动物学杂志,2010,45(5):129-135.

[9] 李建林,唐永凯,陈文华,等. 吉富罗非鱼微卫星标记与体质量、体形性状相关性分析[J]. 中国水产科学,2009,16(6):824-832.

[10] Sherwood S W,Patton J L. Genome evolution in pocket gophers (genus *Thomomys*) [J]. Chromosoma,1982,85(2):163-179.

[11] 宋苏祥,刘洪柏,孙大江,等. 施氏鲃的核型及 DNA 含量研究[J]. 遗传,1997,19(3):5-8.

[12] 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[J]. 动物学报,1995,41(4):370-374.

[13] 张晓军,周岭华,相建海. 刀额新对虾染色体核型及细胞核 DNA 含量[J]. 海洋与湖沼,2002,33(3):225-231.

[14] 吴洪喜,柴雪良,吴建波,等. 三种蚶 DNA 含量和种间亲缘关系的探讨[J]. 水产科技情报,2000,27(2):51-53.

[15] 方旅平,张馥厚,曹文清,等. 刀额新对虾和日本囊对虾细胞核 DNA 含量的测定与比较[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2007,46(1):146-148.

[16] 顾若波,徐钢春,闻海波,等. 太湖似刺鲃染色体组型分析及细胞核 DNA 含量[J]. 水产学报,2009,33(1):9-14.

[17] 尹洪滨,范兆廷,潘 峰,等. 奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼核型及 DNA 含量的比较研究[J]. 东北林业大学学报,1995,23(1):46-51.

[18] 黄永春,李文静,林祥日,等. 星洲红鱼形态、染色体组型及细胞核 DNA 含量的分析[J]. 淡水渔业,2011,41(5):3-8.

[19] 许晓军,杜建明,张海琪,等. 翘嘴鲌和翘嘴红鲌血细胞 DNA 含量测定[J]. 浙江农业学报,2012,24(3):392-395.