

鲶鱼染色体的显带研究*

耿德贵 朱玉山 刘贤德

(徐州师范大学生物系 徐州 221009)

摘要 对鲶鱼染色体进行 Ag-NORs, C-带, CMA₃/DA/DAPI 三重荧光染色及复制带显带的研究。结果发现, 鲶鱼 Ag-NORs 定位在 m₁q 的末端, 具有一种特殊的形态和数目多态现象, 即染色体上的 NORs 发生串联重复。该种鱼只有部分染色体呈现阳性 C-带, 所显示的异染色质可分为三类: 着丝粒异染色质、端粒异染色质和居间异染色质, 其中 m₁ 的整个长臂都被深染, 是 C-带染色最深, 染色面积最大的区域。CMA₃ 染色显示, NORs 处呈现出明亮的荧光。采用 BrdU-Hoechst-Giemsa 方法, 获得了该种鱼的复制带图象, 分为早、中、晚期。从早期到晚期, 带纹逐渐减少, 复制中期可看到着丝粒区、端粒区和居间区, 其中特别是 NORs 处浅染。文中根据实验结果, 对次缢痕、Ag-NORs、C-带、CMA₃ 染色和复制带之间关系等问题进行了讨论。

关键词 鲶鱼 Ag-NORs C-带 荧光染色 复制带

从本世纪 70 年代初以来, 许多学者试图将多种染色体显带技术应用于鱼类染色体分析, 但多数报道仅限于 C-带、Ag-NORs 和 CMA₃ 荧光染色。少数作者进行了复制带、Q-带、G-带、R-带等的研究, 其中染色体复制带取得了比较满意的结果, 获得了清晰的带纹^[1-3], 这对鱼类染色体研究的深入起到了促进作用。而 G-带、Q-带、R-带图象很不理想。

鲶鱼在我国分布很广, 是颇受欢迎的经济鱼类, 国内对于该种鱼的研究仅限于核型。余先觉等^[4]确认鲶鱼的 $2n = 58$ 、 $NF = 102$, 核型公式为 $2n = 20m + 24sm + 10st + 4t$, 未发现异型性染色体。我们对该种鱼的染色体进行了显带研究, 为进一步了解其细胞遗传学特征提供了新的资料。

1 材料方法

1.1 材料 鲶鱼 (*Silurus asotus*): 9♂, 6♀, 购自成都市集贸市场。

1.2 方法 采用活体注射秋水仙素, 常规空气干燥法制片。复制带染色体标本制备方法, 按 Giles 等^[3]的方法稍作修改: 按 0.5~1 mg/g 鱼体重的剂量, 腹腔注射 BrdU (10mg/ml, 溶解于 0.85% 生理盐水) 17~19 小时。处死前 2 小

时按 5~10 μg/g 鱼体重注射秋水仙素。核仁组成区银染采用 Howell 和 Black 的方法。C-带采用 Sumner^[6]的方法并稍作修改, 50℃ 的 5% Ba(OH)₂ 水溶液中处理约 30~60 秒, 用 10% Giemsa 染液染色 30 分钟。CMA₃/DA/DAPI 三重荧光染色采用王子淑等人的方法^[5]并稍做修改, 500 μmol/L 色霉素 A₃ 中 (pH7.0 McIlvaine 缓冲液配制) 染色 30 分钟。复制带显带步骤参考洪云汉等^[1]人的方法。

2 结果

2.1 Ag-NORs 共观察 2 条鲶鱼 (1♂, 1♀) 98 个中期分裂相。

鲶鱼的 Ag-NORs 位于 m₁q 末端, 分布在一对同源染色体上 (见图 1); 并发现一种特殊的 Ag-NORs 数目与形态多态现象, 即一条或两条染色体上 Ag-NORs 发生串联重复, 重复的 Ag-NORs 在同一条染色体上紧靠在一起, 重复后的 Ag-NORs 大小相当于未重复的 2 倍。

2.2 C-带 共观察 2 条鲶鱼 (1♂, 1♀) 57 个中期分裂相。

* 本文为研究生基金资助项目;

第一作者介绍: 耿德贵, 男, 30 岁, 讲师, 硕士;

收稿日期: 1997-08-18, 修回日期: 1998-03-69

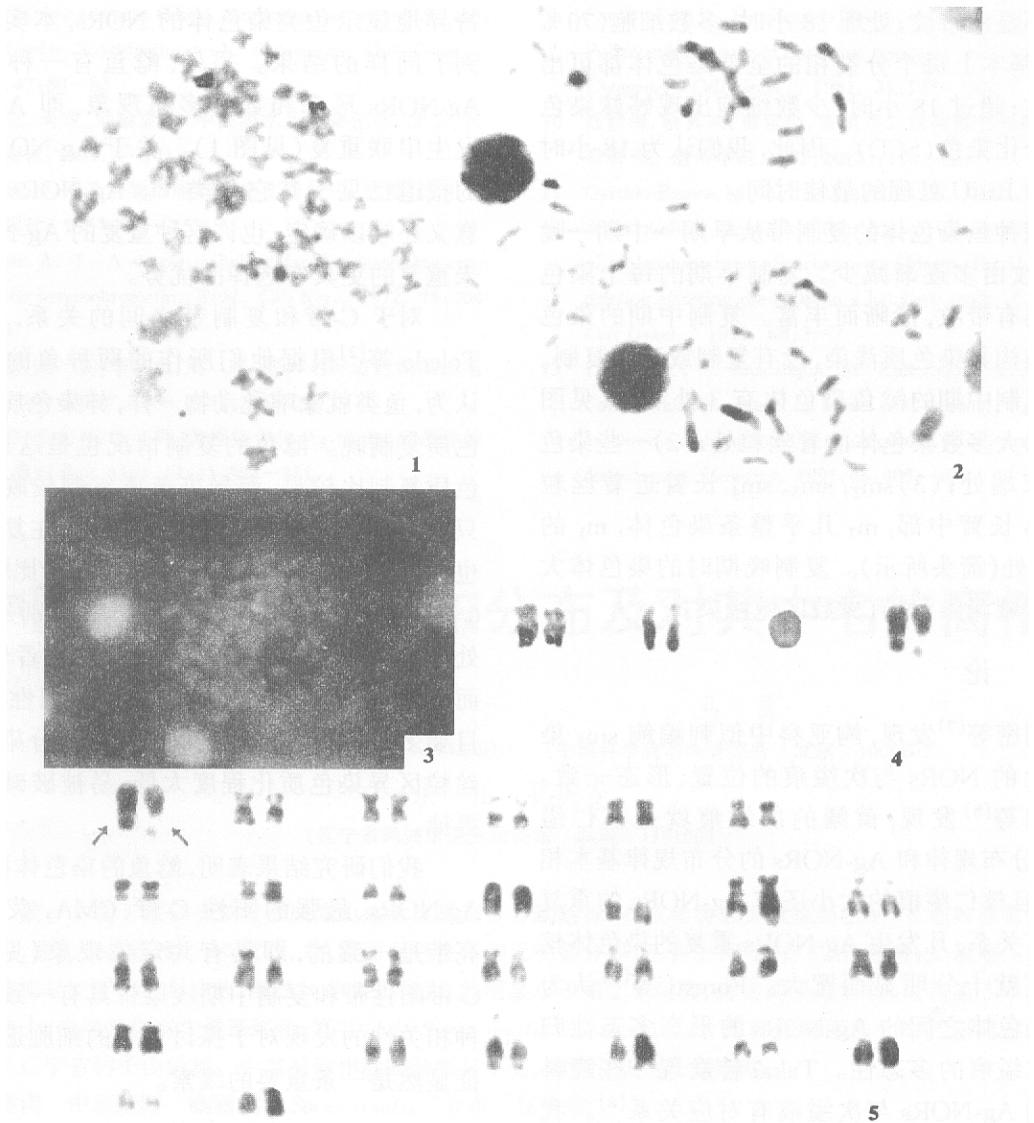


图1 图2 图3 图4 图5

C-带染色主要用于显示结构异染色质的分布和数量。鲑鱼只有部分染色体呈C-带阳性(见图2)。根据结构异染色质在染色体上分布的位置不同,可分为:(1)着丝粒异染色质:该种鱼只有部分染色体着丝粒区呈C-带阳性。(2)端粒异染色质:其仅有4~5对染色体的两端或一端呈C-带。(3)居间异染色质:鲑鱼6对左右的染色体在臂间呈C-带阳性,其中 m_1 两条染色体的整个长臂都被深染,是所有染色体中染色面积最大,染色最深区域。

2.3 CMA₃/DA/DAPI 三重荧光染色 共观察2条鲑鱼(1♂, 1♀)45个中期分裂相。

鲑鱼染色体经三重染色后,用U激发时发现所有染色体都呈现均匀的荧光,无带纹分化;用B激发时,NORs呈现明亮的荧光(见图3)。分析经CMA₃染色的间期核发现,同一鲑鱼个体大多数细胞也具有两个明亮荧光区,大小相同或相差2倍左右,少部分细胞具有3个明亮区或1个明亮区。

2.4 复制带 共观察4条鲑鱼(3♂, 1♀)173个中期分裂相。

在试验中我们发现,用BrdU处理时间低于12个小时,没有或很少有带纹分化,即使在同一分裂相也往往是有的染色体显示出带纹,

有的不显示带纹;处理 18 小时,多数细胞(70%以上)基本上每个分裂相的全部染色体都可出现带纹;超过 18 小时,少数细胞出现姊妹染色单体分化染色(SCD)。因此,我们认为 18 小时左右为 BrdU 处理的最佳时间。

该种鱼染色体的复制带从早期→中期→晚期,带纹由多逐渐减少。复制早期的每个染色体都具有带纹,清晰而丰富。复制中期的染色体上结构异染色质浅染,没有复制或正在复制。处于复制中期的鲶鱼染色体有 3 处浅染(见图 5):(1)大多数染色体的着丝粒处;(2)一些染色体的末端处;(3)sm₂, sm₃, sm₄ 长臂近着丝粒处, sm₇ 长臂中部, m₇ 几乎整条染色体, m₁ 的 NORs 处(箭头所示)。复制晚期时的染色体大多数区域深染,只有少数区域浅染。

3 讨论

周密等^[7]发现,鲇亚科中似刺编鲇 sm₃ 染色体上的 NORs 与次缢痕的位置、形态一致。任修海等^[8]发现,黄鳝的次缢痕就是核仁缢痕,其分布规律和 Ag-NORs 的分布规律基本相同,而且核仁缢痕的大小还与 Ag-NORs 的重复与否有关系,凡发生 Ag-NORs 重复的染色体核仁缢痕就十分明显而宽大。Foresti 等^[9]认为同源染色体之间的 Ag-NORs 的形态多态性归因于次缢痕的多态性。Takai 曾发现一些鲤科鱼类的 Ag-NORs 与次缢痕有对应关系^[8]。我们发现鲶鱼具有次缢痕的染色体出现 Ag-NORs 的频率很高,而不具有次缢痕的染色体出现 Ag-NORs 的频率低得多。

我们作鲶鱼 C-带时发现,碱性溶液处理时间不同,所得结果也不相同。处理时间不足(低于 40 秒),所有的染色体都深染而无分化;处理时间过久(多于 5 分钟)则所有的染色体都浅染也无分化。但在一定时间范围内(40 秒~5 分钟),NORs 总被深染,说明 NORs 处异染色质化程度高,使得此处的 DNA 更耐受碱性溶液的抽提。

一些作者已进行了荧光染料 CMA₃ 对鱼类染色体染色的实验^[7-12],结果表明 CMA₃ 可

特异地显示鱼类染色体的 NORs,本实验也得到了同样的结果。另外,鲶鱼有一种特殊的 Ag-NORs 形态和数目多态现象,即 Ag-NORs 发生串联重复(见图 1)。关于 Ag-NORs 重复的报道已见于其它鱼类^[4]。Ag-NORs 重复的意义还难以确定,也许这种重复的 Ag-NORs 较未重复的更具有选择的优势。

对于 C-带和复制带之间的关系,Almeida Toledo 等^[2]根据他们所作的两种鱼的复制带认为,鱼类就象哺乳动物一样,异染色质比常染色质复制晚。鲶鱼的复制情况也是这样,常染色质复制比较早,而异染色质复制较晚。鲶鱼只有一些染色体末端呈 C-带阳性,在复制中期也只有部分染色体末端为浅染,两者比较一致,6 对左右的染色体在居间区,其中特别是 NORs 处呈 C-带阳性,在复制中期浅染,两者也一致,而其着丝粒处复制浅染带数目比阳性 C-带数目要多,二者不太一致,很可能是部分染色体着丝粒区异染色质化程度太低,易被破碱溶液抽提掉。

我们研究结果表明,鲶鱼的染色体次缢痕、Ag-NORs、最强的阳性 C-带、CMA₃ 荧光染色亮带是一致的,即具有共定位现象(见图 4)。C-带阳性带和复制中期浅染带具有一致性。这种相关性的发现对于探讨鱼类的细胞遗传学特征显然是一条重要的线索。

致谢 此研究 1996 年于四川联合大学生物系细胞室进行,在导师王喜忠教授指导下完成,谨此致谢。

参 考 文 献

- 1 洪云仪,周 曦 鱼类染色体显带的研究 I. 鱼类染色体复制带显带的 BrdU-Hoechst-Giemsa 方法. 遗传学报, 1985, 12(1): 67-71
- 2 Almeida Toledo, L. F., E. Viegas-Pequignot, F. Foresti, S. A. Toledo Filho, B. Dutrillaux BrdU replication patterns demonstrating chromosome homoeologies in two fish species, genus *Eigenmannia* Cytogenet. Cell Genet., 1988, 48: 117-120
- 3 Giles, V., G. Thode, M. C. Alvarez. Early replication

- bands in two scorpion fishes, *Scorpaena porcus* and *S. notata* (order Scorpaeniformes). *Cytogenet. Cell Genet.*, 1988, **47**:80~83
- 4 余先觉,周瞰,李渝成等.中国淡水鱼类染色体.北京:科学出版社,1989.1~171
- 5 王子淑.人体及动物细胞遗传学实验技术.成都:四川大学出版社,1987.151~155
- 6 Sumner, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell Res.*, 1972, **75**:304~306
- 7 周密,康扬,李渝成,周瞰.鲤科七种鱼的银染核型研究.动物学研究,1988, **9**(3):225~229
- 8 任修海,余其兴,韦萍.黄鳍染色体 Ag-NORs 多态性的研究.遗传学报,1991, **18**(4):304~311
- 9 Foresti, F., L. F. Almeida Toledo and S. A. Toledo F'. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1981, **31**:137~144
- 10 任修海,余其兴,崔建勋,常重杰.鱼类染色体的荧光显带研究.遗传学报,1993, **20**(2):116~121
- 11 Garrido-Ramos, M. A., M. Jamilena, R. Lozano, S. Cardenas, C Ruiz Rejon, M. Ruiz Rejon. Cytogenetic analysis of gilthead sea-bream *Sparus aurata* (Pisces, Perciformes), a deletion affecting the NOR in a hatchery stock. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1995, **68**:3~7
- 12 Lozano, R., C Ruiz Rejon, M Ruiz Rejon. An analysis of Coho salmon chromatin by means of C-banding, Ag-and fluoro-chrome staining, and in situ digestion with restriction endonucleases. *Heredity*, 1991, **66**:403~409