

科学实验

大连紫海胆染色体制备的研究

胡庆明 许伟定 隋锡林 王志松 李国友

(辽宁省海洋水产研究所, 大连 116023)

提 要

采用大连紫海胆早期胚胎制备染色体。大连紫海胆染色体数为 $2n=46$ 。

关键词: 大连紫海胆 染色体 二倍体 早期胚胎

材料和方法

一、取材地点:

试验所用海胆取自黄海北部大连黑石礁养殖场附近海域。

二、染色体制备:

9月中旬用性成熟的海胆取 0.5M 浓度的 KCl 溶液 2ml 注入海胆体腔内刺激产卵。将试验海胆反口面置于 5000ml 三角烧瓶瓶口上, 分别收集成熟的卵和精子。然后取一定数量的未受精卵放入试管中, 再用 3mM 浓度的 DTT (dithiothreitol 二硫苏醇) 处理 10 分钟, 漂洗后移入自然海水中,

将经海水漂洗后的未受精卵移入 500ml 烧杯中, 加进数滴精液进行人工授精。镜检受精卵其受精膜全部除去。然后受精卵于常温海水中, 正常卵裂发育至胚胎。

待受精卵发育至早期胚胎, 用 0.05% 浓度的秋水仙素处理 30 分钟, 然后用无钙海水漂洗 2 次, 用吸管吹打胚胎细胞使其分散。再用 0.075M 浓度的 KCl 低渗液处理 30 分钟。然后用新配制的卡诺固定液 (甲醇:冰醋酸=3:1) 固定 2 次, 每次 15 分钟。

固定后采用热滴片法滴片, 待细胞散开, 干燥后用 10% Giemsa (pH6.8) 染液染色,

大连紫海胆 (*Strongylocentrotus nuda*) 学名光棘球海胆, 俗名黑刺锅子。属棘皮动物门、海胆纲、球海胆科。海胆生殖腺味道鲜美, 并可提取药物, 是我国北方重要的海产经济动物之一。国内为满足食用和出口的需要, 目前已开展人工增养殖。

早在本世纪初, 一些学者曾对海胆染色体的制备方法进行了研究。Pinnery (1911) 用切片法从受精卵观察 (*Hippone esculenta*) 海胆染色体数目为 30、32 或 33。Tennent (1912) 用同样方法制做毒棘海胆 (*Toxopneustes Variegatus*) 染色体数目为 36、37 或 38; (*Hippone esculenta*) 海胆的染色体数目为 33、34。上述方法均未获得染色体的准确数目。50 年代 Makino 和 Alfert (1954) 用海胆胚胎整体装片, 用盖玻片轻压胚胎观察染色体数, 也未获得满意的结果。

80 年代日本学者用吸管除去受精膜, 制备海胆胚胎染色体, 确定日本榑海胆 (*Clypeaster japonicus*) 染色体数目为 46。

国内董宝贤、林泰禧 (1991) 采用与上述相似的方法观察马粪海胆 (*Hemicentrotus Pulcherrimus*) 染色体数目为 46。大连紫海胆染色体数目迄今国内外尚未报导, 现将我们制备染色体的方法及结果报告如下:

表1 大连紫海胆染色体数目

染色体数目(A)	23	30	40	42	43	44	45	46	47	48	总数
细胞数目(B)	1	1	5	4	4	7	8	58	3	5	93
$\frac{B}{A} \times 100\%$	1	1	5.2	4.2	4.2	7.3	8.3	60.4	3.1	5.2	100

1小时后用自来水冲洗,自然干燥后封片。镜检(10×100)计数染色体数目。观察染色体中期分裂相结果如表1。染色体照片如图版I。

图1 大连紫海胆染色体
 $2n=46$

结果与讨论

从大连紫海胆96个染色体中期分裂相中观察,其中58个细胞的染色体数目为 $2n=46$,比例为60.4%,1个细胞染色体数目为 $n=23$,比例为1%;其余49个细胞染色体数为非整倍体,比例为38.5%。从而可确定大连紫海胆染色体数目为 $2n=46$ 。非整倍体细胞中,染色体数目为 $2n=46 \pm 2$ 的细胞比例为23.9%,可能是制片过程中离心、滴片、冲洗等操作过程使染色体流失所致。

大连紫海胆染色体数目与同科同属的马粪海胆的染色体数,以及不同科的日本榧海胆的染色体数目相同。尽管上述报导某些海胆染色体数目为30余条,因染色体制备方法所限,计数染色体数不准确,很可能不同品种海胆染色体数目相同,只是在核型上有差异。目前国内

外关于海胆染色体核型研究尚未报导,可能是海胆染色体较小,用(10×100)倍显微镜难以分辨观察。

用3mM浓度的DTT处理未受精卵10分钟,待受精后,其受精膜均未形成。受精膜是由卵膜原基演变,由于卵膜化学组成中,S-S基的结合反应,引起膜的硬化,难以用机械方法即吸管吹打除去。药物DTT还原剂含有SH还原基能抑制膜的硬化,使受精卵不形成受精膜,并无副作用,起到既不损伤卵细胞又能去膜的作用。经处理的受精卵可正常发育至胚胎。

笔者曾用海胆早期幼体制备染色体,因幼体含骨针,用秋水仙素等药品处理难以获得满意的效果。采用早期胚胎为制备染色体的材料,因其卵黄少,且细胞大,在染色体制备过程中,可获得大量的分裂相,并且试验重复性好。

目前海洋生物染色体的研究正在普遍开展,而棘皮动物染色体的研究甚少,上述制备染色体的方法可供棘皮动物制做染色体标本参考。

参考文献

- (1) 和振武译1935.海胆胚胎染色体标本制作方法.生物学通报,11:43,46.
- (2) 董宜贤、林嘉禧.1991.马粪海胆的染色体制备和染色体数目.青岛海洋大学学报,21(3):131~132.
- (3) Pinney, E. 1911. A study of the chromosomes of *Hippone esculenta* and *Moiria atropos*. Biol. Bull. 21:168-185.
- (4) Tennent, D. H. 1912. The behavior of the Chromosomes in Cross fertilized echinoid eggs. J. Morph. 23: 17-23.
- (5) Makino, S. 1952. A review of the Chromosomes in animals. Hokuryukan, Tokyo 33-35.
- (6) Agrell, I. 1937. Partial fertilization of the sea urchin egg by the action of oestradiol. Ark. zool. 10:491-497.
- (7) 石川优等, 1988. 海产无脊椎动物の発生实验. 169~173.