

参加中国水产学会第四次全国会员代表大会 暨学术讨论会(1987. 11. 北京)交流论文

目 次

鱼类染色体高分辨BG和B显带的研究·····林义浩、小島吉雄 (1)	
在鱼类的同一分裂相连续显示高分辨B或BG带、C带和NORs	
的研究·····小島吉雄、林义浩 (8)	
制备小型鱼类染色体标本的PHA二次注射法·····	
·····林义浩、小島吉雄 (13)	

广东省韶关市水产研究所

1987年10月

鱼类染色体高分辨BG和B显带的研究

林 义 浩

小 岛 吉 雄

(广东省韶关市水产研究所)

(日本国关西学院大学理学部)

摘 要

本文报导了直接从活体鱼获得高分辨染色体的方法。经2次PHA和3—6次BUdR体内注射后,取实验鱼的肾细胞作AMD体外处理,然后制成掺合有BUdR的染色体标本,再施加不同的染色处理以显示带纹,分别称为高分辨BG和B显带。4种实验鱼染色体明显伸长并显示带纹的分裂相占计数分裂相总数的 $21.72 \pm 8.11\% - 56.33 \pm 6.99\%$ 。*Synodontis nigriventris*为 $56.33 \pm 6.99\%$ 。采用上述方法,在后前期、早中期、正中期甚至晚中期分裂相均获得高分辨BG或B显带染色体。尤以早中期分裂相的染色体带纹丰富且清晰。

现存2万多种鱼类中,作过染色体考查的已达1539种,但显带研究的不多,可以识别单个染色体的显带研究的只有少数几种(Ojima, Y. 1986)。由于鱼类的染色体个体小、数量多,加上可能存在的自身结构组成方面的原因,长期以来,包括G显带在内的可以识别单个染色体的显带研究难以取得成功。我们采用PHA和BUdR体内注射诱发肾细胞的特殊细胞周期,以在数小时内获得染色体掺合有BUdR的分裂细胞,辅以AMD体外处理以利于染色体伸长,再施加不同的染色处理,建立了不需经由体外细胞培养,直接从活体鱼获得高分辨染色体的方法,并分别称为高分辨BG和B显带方法。现报导如下。

材 料 与 方 法

实验鱼4种,分别为Mochokidae科的*Synodontis nigriventris*, Curimatidae科的*Brycinus longipinnis*以及Cyprinidae科的*Hemibarbus labeo*(重唇鲮)和*Rhodeus morio* (重唇鲮),体重0.8—5.0g,均购自日本神户市的观赏鱼商店。本实验在日本关西学院大学理学部小岛研究室进行。

1. 掺合有BUdR的染色体标本的制备

实验鱼经2次PHA注射和3—6次BUdR注射之后,取出其肾脏供染色体标本制作。PHA注射剂量第一次为0.010—0.020ml/g(体重),第二次为0.015—0.025ml/g(体重)。

第二次PHA注射在第一次PHA注射后18—20小时进行。自第二次PHA注射前2小时开始注射BUdR,此后每隔1.0—1.5小时注射一次,剂量均为60—80 μ g/g(体重)。在第二次PHA注射后5—6小时,取出肾脏制成细胞悬液,滴加秋水仙素,使终浓度为0.01—0.02 μ g/ml,处理1—1.5小时之后,再加入AMD,使终浓度为0.5—1.0 μ g/ml,继续处理40—50分钟。此后经0.0375MKCl低渗处理25—30分钟,甲醇—冰醋酸(3:1)三次固定,冰片滴片,空气干燥。

2. 高分辨BG显带

将玻片标本置于30℃的2 $\times$ SSC处理30—30分钟,然后用2%的Giemsa(Sorrensen's)缓冲液,pH7.0)染色10—20分钟。

3. 高分辨B显带

染色方法依Takayama, S.等(1979)加以修改。将玻片标本用1%的硫堇处理2—5分钟,然后用预冷的EDTA—Giemsa染色10—15分或在室温染色5—6分钟。

结 果

实验结果表明,采用上述方法,4种实验鱼的染色体,包括后前期、早中期和正中期染色体均明显伸长并显示出丰富的带纹(图1—2)。随着染色体的明显伸长,带纹的数量也明显增加,甚至最小的染色体也得以识别。*S. nigriventris* B组第1号染色体的带纹数量,早中期达16—18条(图1. C箭头所示),近早中期和正中期为12—13条(图1. B和D箭头所示),晚中期也有7—8条(图1. E箭头所示)。虽然早中期和正中期染色体的带纹数量未及后前期染色体,但带纹更为清晰,更适于染色体带型分析。以上结果也见之于其他3种实验鱼。

本文方法可获得大量分裂相。染色体明显伸长并显示出带纹的分裂相占计数分裂相总数百分数的统计结果列于表1。*S. nigriventris*平均为56.33 $\pm$ 6.99%,个别个体高达66.96%。其他3种实验鱼,*B. longipinnis*为49.70 $\pm$ 7.75%,*H. labeo*和*R. moriokae*分别为34.15 $\pm$ 17.51%和21.72 $\pm$ 8.11%。

表1 4种实验鱼染色体明显伸长并显示带纹分裂相占计数分裂相总数的百分数

鱼 别	实验鱼数	计数分裂相总数	染色体明显伸长并显示带纹分裂相% ($\bar{X} \pm S$)	范围 %
<i>Synodontis nigriventris</i>	4	679	56.33 $\pm$ 6.99	35.94—66.96
<i>Brycinus longipinnis</i>	6	493	49.70 $\pm$ 7.75	36.00—71.90
<i>Hemibarbus labeo</i>	8	676	34.15 $\pm$ 17.51	20.77—55.63
<i>Rhodeus moriokae</i>	8	620	21.72 $\pm$ 8.11	7.48—35.23

讨 论

PHA作为一种有丝分裂刺激剂,能够刺激体外培养鱼类肾细胞的分裂增殖。Yamamoto, K. 等(1973)用 ^3H -胸腺嘧啶核苷标记的放射自显影研究表明,鲤鱼肾细胞—PHA体外培养72小时,合成DNA的细胞数约45%,未加入PHA培养只有约22%。李康等(1983)用改良的SCD方法对鲢鱼肾细胞—PHA体外培养增殖动力学的研究指出,培养38—42小时,第一次分裂细胞占88.5—81.9%;培养72—76小时,第二次分裂细胞占51.5—59.2%,第一次分裂细胞占38.0—27.9%,第三次分裂细胞占10.5—12.9%。草鱼肾细胞—PHA体外培养24小时,分裂指数为0.00;培养48小时为3.22;培养72小时为5.59¹。鱼类培养肾细胞细胞周期方面的研究不多。根据上述有关研究,可见鱼类体外培养肾细胞分裂增殖的动态变化与人外周淋巴细胞大体相似。然而,PHA既是有丝分裂刺激剂,同时也是细胞免疫刺激剂。PHA体内注射时,不仅同样能够刺激鱼类肾细胞的分裂增殖,而且在数小时内便可获得大量肾细胞分裂相(林义浩,1982)。PHA二次注射,比一次注射更有利于促进肾细胞的有丝分裂(林义浩等,将发表)。这就表明体内环境和体外环境存在着质的差异,提示了在体内注射条件下,PHA能够至少在部分肾细胞诱发特殊细胞周期。本研究正是基于这一点,并且,研究结果进一步肯定了这一点。在4种实验鱼均获得高分辨染色体。染色体显示带纹的分裂相计数分裂相总数的百分数以*S. nigriventris*最高,达到 $56.33 \pm 6.99\%$,以*R. moriokeae*最低,为 $21.71 \pm 8.11\%$,表明这些染色体掺含有BUdR并显示带纹的分裂细胞至少在7—8小时内完成了S期(DNA合成期),经过G₂期进入M期。

Hsu, T. C. 等(1961)首先在细胞遗传学研究中开始应用BUdR。Arright, F. E. 等(1965)首先以AMD处理体外培养的中国仓鼠细胞。Shafer, D. A. (1973)以AMD处理G₂期的人淋巴细胞,首次得到满意的G带染色体。BUdR可在S期掺入复制中的DNA(Dutrillaux, B. 等, 1981),干扰DNA分子的三级结构,减弱螺旋化程度,使染色体伸长(Palmer, G. G. 等, 1965)。正是由于BUdR和AMD等在人和哺乳动物染色体研究中的应用,导致高分辨G显带技术的出现。BUdR和AMD也已开始应用于鱼类培养淋巴细胞的处理,以诱发高分辨G带(Liu, L.-Y., 1986)。本文采用PHA和BUdR体内注射引起肾细胞特殊细胞周期,使BUdR在短时间内掺入DNA分子,经AMD体外处理,再进行不同程序的染色,建立了鱼类染色体高分辨BG和B显带方法。AMD和BUdR对染色体有诱变作用,AMD更是众所周知的典型诱变剂,在高浓度时,可引起染色体畸变或断裂并导致分裂相减少。有鉴于此,本文提出的BUdR和AMD的处理剂量、处理时间及其处理顺序均经过试验选择。

ASG方法(Sumner, A. T. 等, 1973)是人类染色体G显带常用的一种方法,但至今未见应用于鱼类染色体G显带取得成功的报导。本文采用这一方法对掺含有BUdR并经AMD处理的鱼类染色体进行染色处理,获得满意的结果,明显伸长了的染色体显示出丰富而清晰的

1); 林义浩等, 1984. 全国草鱼病研究学术讨论会论文汇编(中国科学院水生生物研究所编),

带纹。为了与其他类型的显带相区别,这一鱼类染色体的显带方法称为高分辨BG显带。

Takayama, S.等(1982)以4 Na·EDTA染色法(Takayama, S., 1979)对掺含有BUdR的小鼠染色体进行染色,得到与G显带相似的带纹,并称为B显带。本研究改进了这一染色方法,将掺含有BUdR并经AMD处理的染色体先用硫酸处理,再用4 Na·EDTA染色法染色,得到的带纹更加丰富更为清晰。本文将这一鱼类染色体的显带方法称为高分辨B显带。

人类以及哺乳动物染色体高分辨显带近年来进展迅速,已从正中期和早中染色体显带发展到后前期染色体显带,目的在于增加带纹的数量并提高清晰度(Rohme, D.等, 1982)。但是,在本研究中,可能由于鱼类染色体个体小,后前期染色体过于纤细,虽然带纹数量有所增加,但清晰度降低,早中期和正中期染色体带纹数量不及前者,但带纹清晰,因而更适于作染色体带型分析和细微结构的研究,也更适于在同一分裂相连续多重显带。我们采用本文方法得到高分辨BG或B带之后,对同一分裂相进行C显带和NORs检测,已获得成功。

鱼类是脊椎动物中分布最广、种类最多的一个类群,具有极其多样的生物学特性和重大经济价值。推进鱼类染色体研究,对研究鱼类的遗传、变异、分类、系统演化以及应用新技术育种等,都具有重要意义。但是,主要由于方法学方面的原因,鱼类染色体的显带还处于早期阶段。迄今已发表的有关显带研究的论文尚不足40篇,且大多是C带和NORs。本文方法的建立,为识别每一个染色体和考察染色体的细微结构,深化鱼类染色体的研究,提供了一种简便、快捷的新手段。

参 考 文 献

- 李康、李渝成、周敏, 1983. 细胞生物学杂志, 5(3): 26—30.
林义浩, 1982. 水产学报, 6(3): 201—208.
Arright, F. E. and T. C. Hsu, 1965. D. Exp. Cell Res., 39: 305—308.
Dutrillaux, B. and E. Viegas—Pequignot, 1981. Hum. Genet., 57: 93—95.
Hsu, T. C. and C. E. Somers, 1961. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 47: 396.
Liu, L.—Y., 1986. Proceedings of Second International Conference on Indo—pacific Fishes (Ed. Uyeno, T., Arai, R., Taniuchi, T. and K. Matsuura), pp. 910—917.
Ojima, Y., 1986. Fish Chromosome Data Reterval List, Ojima Lab., Kwansei Gakuin Univ.
Palmer, C. G. and S. Funderburk, 1965. Cytogenet., 4: 261—276.
Rohme, D. and W. K. Heneen, 1982. Premature Chromosome Condensation, Application in Basic, Clinical, and Mutation Research (Ed. Rao, P. N., Johnson, R. T. and K. Sperling), pp. 131—153.
Shafer, D. A., 1973. Mammalian Chromosomes Newsletter, 14: 16.
Sumner, A. T., Evans, H. J. and R. A. Buckland, 1971. Nature New Biol., 232: 31—32.
Takayama, S. and K. Matsumoto, 1982. Chromosoma (Berl.) 85: 583—590.
——— and K. Tachibana, 1980. Proc. Jpn. Acad., 58(B): 303—306.
Yamamoto, K. and Y. Ojima, 1937. Jpn. J. Genet., 48: 235—238.

STUDIES ON DEVELOPING HIGH RESOLUTION BG—AND B—BANDING IN FISH CHROMOSOMES

Lin Yihao

(Shaoguan City Fisheries Research Institute of Guangdong Province)

Yoshio Ojima

(Faculty of Science, Kwansei Gakuin University, Japan)

Abstract

The new techniques for observing high resolution banding in fish chromosomes from living body are reported. After PHA injection 2 times and BUdR injection 3—6 times in vivo, the kidney cells were taken out and treated with AMD, and then used for preparation of BUdR—substituted chromosome slides. High resolution banding was developed with two different stain methods and therefore they were called the high resolution BG— and B—banding respectively in this paper.

The rates of mitotic figures in the elongated and banded chromosomes are 21.72—56.33 percent for 4 experimental species of fishes, and that in *Synodontis nigriventris*, averaging $56.33 \pm 6.99\%$.

Using these techniques, chromosome elongation and high resolution BG— or B—banding were observed in late prophase, early—full—and even late—metaphase figures. In the early—metaphase figures, revealed bands were simultaneously more plentiful and clear.

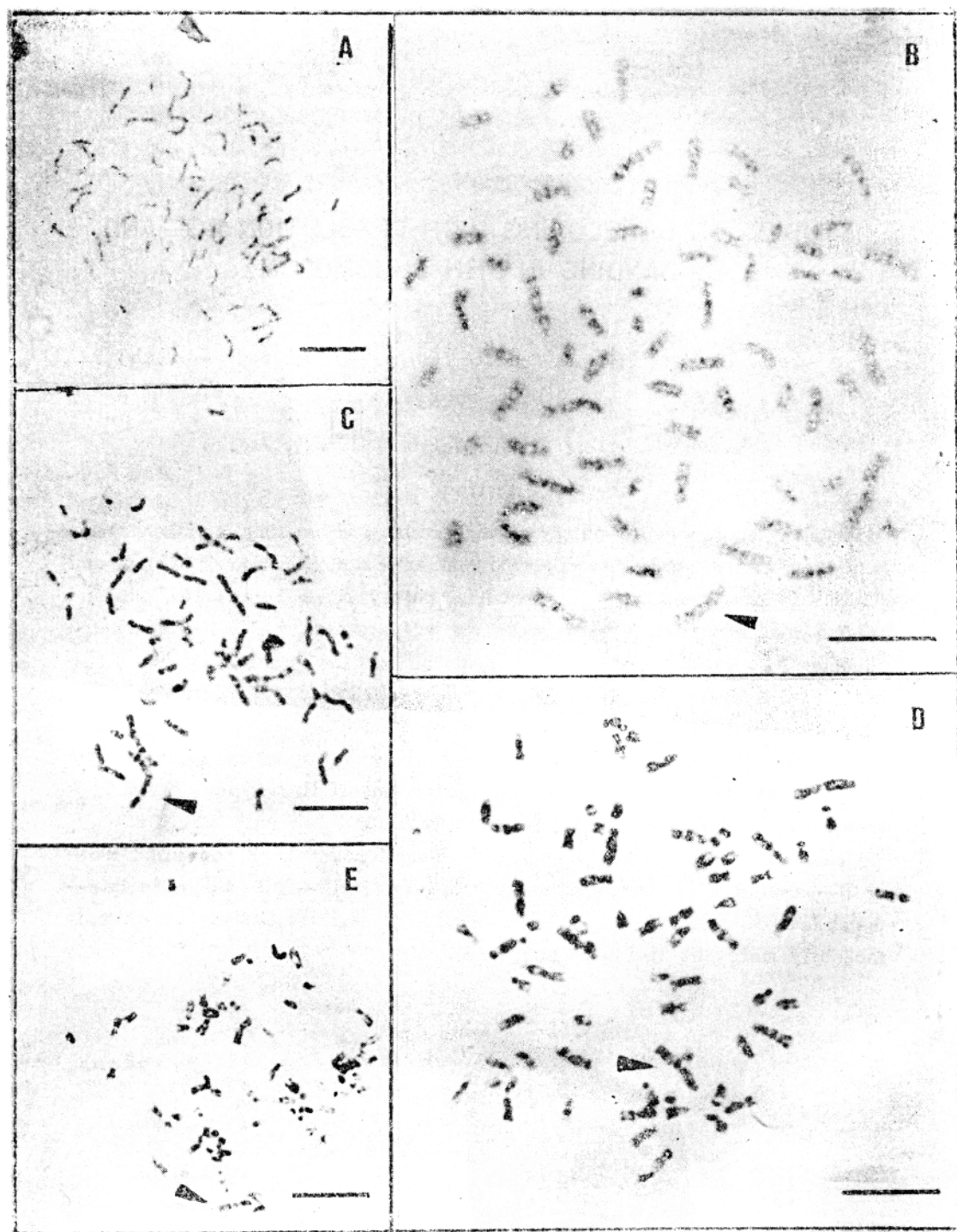


图1.高分辨BG显带处理的*Synodontis nigriventris*肾细胞分裂相($2n=68$)。比例尺表示 10μ 。
A: 近后前期; B: 近早中期; C: 早中期; D: 正中期; E: 晚中期。

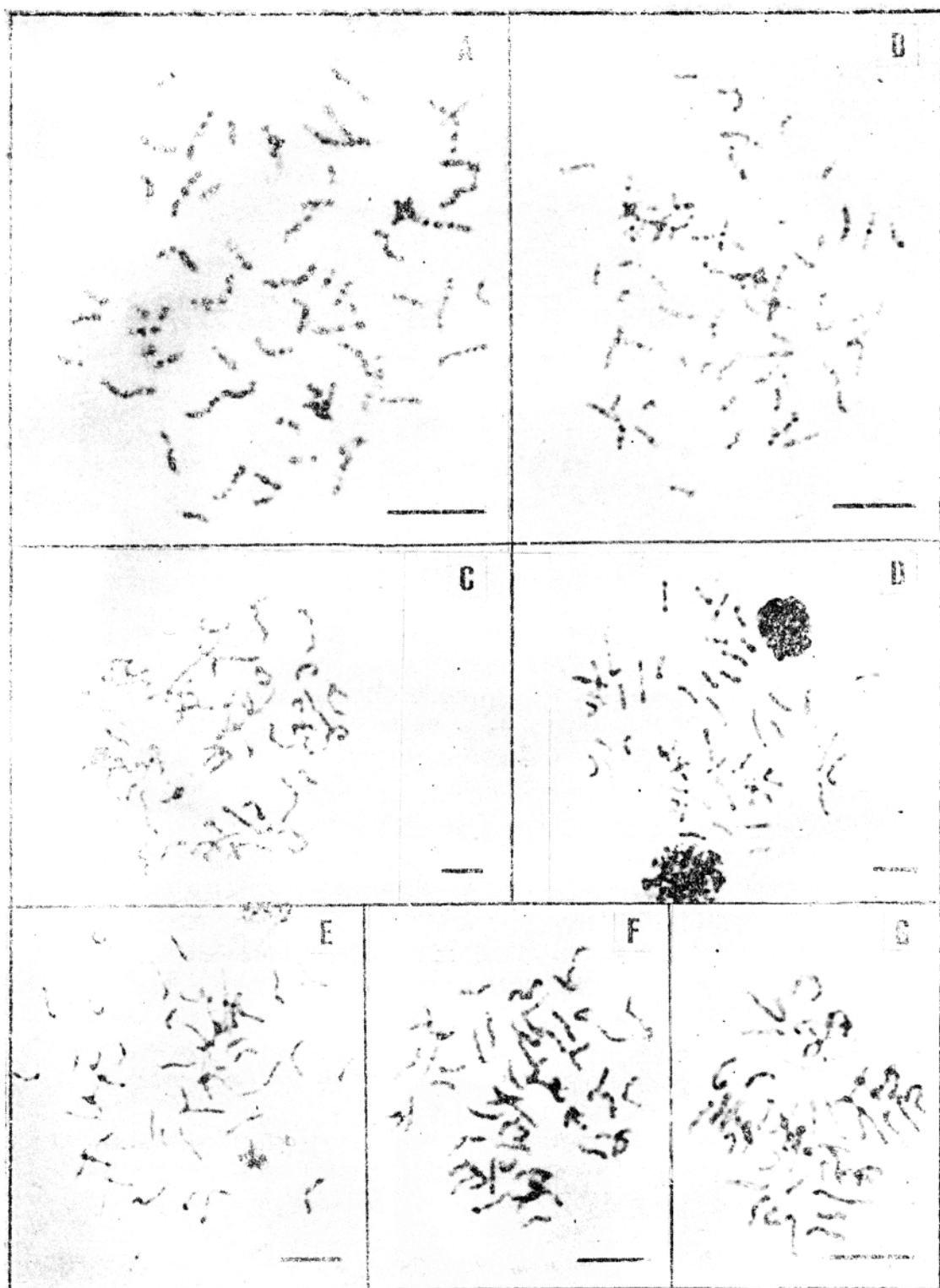


图2 高分辨B显带处理的4种实验鱼的肾细胞分裂相。比例尺表示10 μ 。

A和B: *Synodontis nigriventris*早中期分裂相 ($2n=68$)；C和D: *Hemibarbus labeo*后前期和近早中期分裂相 ($2n=50$)；E和F: *Brycinus longipinnis*后前期和近早中期分裂相 ($2n=54$)；G: *Rhodeus morio*早中期分裂相 ($2n=48$)。

在鱼类的同一分裂相连续显示高分辨B 或BG带、C带和NORs的研究

小島吉雄

(日本国关西学院大学理学部)

林义浩

(广东省韶关市水产研究所)

摘 要

本文报导了在鱼类的同一分裂相连续多重显带, 包括高分辨B或BG带、C带和NORs的新技术。采用经PHA和BUdR体内注射并经AMD体外处理的供试鱼肾细胞制成掺合有BUdR的染色体标本, 首先显示高分辨B或BG带, 方法同林义浩等(1987, 将发表); 然后进行C显带, 方法依Sumner, A. T. (1972); 最后显示NORs, 依Bloom, S. E. 等(1976)的Ag-As方法。在供试的3种鱼中, 同一分裂相均可连续显示不同的斑带。*Synodontis nigriventris*的2个NORs染色体在高分辨BG或B带中有5—8条带; 另2个C带深染的染色体在高分辨BG或B带中有3—8条带。

对同一中期分裂相进行连续多重染色, 以在同一染色体显示出不同的斑带, 是细胞遗传学的重要研究技术之一。但是, 由于能够识别单一染色体的显带长期以来在鱼类染色体难以取得成功, 迄今, 鱼类中同一分裂相的连续多重显带仅见于C带和NORs。在建立了鱼类染色体高分辨BG和B显带方法(林义浩, 将发表)之后, 我们对鱼类的同一分裂相的连续多重显带进行了研究。本文提出了在鱼类的同一分裂相连续显示3种不同斑带, 包括高分辨B或BG带、C带和NORs的新技术。

材 料 与 方 法

实验鱼为 *Mochokidae* 科的 *Synodontis nigriventris*, *Cyprinidae* 科的 *Hemibarbus labeo* 和 *Rhodeus morio* 科的 *Rhodeus morio*, 均购自日本神户市的观赏鱼商店。染色体标本的制备和连续显带的顺序如下:

1. 染色体标本制备和高分辨BG、B显带

掺合有BUdR并经AMD处理的染色体标本的制备和高分辨BG、B显带方法同林义浩等(将发表)。在显微镜下观察, 选择带纹清晰、分散良好的分裂相, 在玻片上作好记号, 进

行显微摄影。然后用二甲苯去油，用3:1的甲醇—冰醋酸漂洗1—2分钟或浸入70%酒精20分钟退色。

2. C显带

将上述经去油、退色的玻片标本置于50℃的5%Ba(OH)₂处理10—40秒钟，再在60℃用2×SSC处理30—60分钟，然后用2%Giemsa (Sorrensen's缓冲液, pH7.0)染色10—20分钟。上述方法与Sumner, A. T. (1972)大体相同。对同一分裂相再次显微摄影之后，用二甲苯去油，70%酒精退色。

3. NORs显示

依Ag—As方法 (Bloom, S. E. 等, 1976)。

结 果 和 讨 论

实验结果表明，掺合有BUdR并经AMD处理的染色体标本在高分辨BG或B显带之后，均可显示C带或NORs，也可连续显示C带和NORs (图1. A—J, 箭头示C带和NORs)。上述掺合有BUdR并经AMD处理的染色体标本在获得高分辨B带之后，还可获得高分辨BG带 (图2. A—B)，并且在进行高分辨B显带之前先用2%Giemsa (Sorrensen's缓冲液, pH5.8)染色，可得到普通的染色体图像 (图2. C)。因此，本文提出的技术能多侧面多角度对同一分裂相的染色体进行综合比较分析。例如，*S. nigriventris* 2个NORs染色体在高分辨BG或B显带中有5—8条带；另2个C带深染的染色体在高分辨BG或B显带中有3—8条带 (图1. E—J箭头所示)。

本文提出的在鱼类的同一分裂相连续多重显带，包括高分辨BG或B带、C带和NORs显示技术，为识别基因组中每一个染色体和探索染色体的细微结构，推进鱼类染色体研究的深化，提供了新的综合手段。

参 考 文 献

- 林义浩、小岛吉雄, 1987. 鱼类染色体高分辨BG和B显带的研究 (将发表)。
Bloom, S. E. and C. GoodPasture, 1976. Hum. Genet., 34:199-206.
Sumner, A. T. 1972. Exp. Cell Res., 75:404-306.

SEQUENTIALLY REVEALING HIGH RESOLUTION B-OR BG-BANDING, C-BANDING AND NORs ON THE SAME FISH MITOTIC FIGURE

Yoshio Ojima

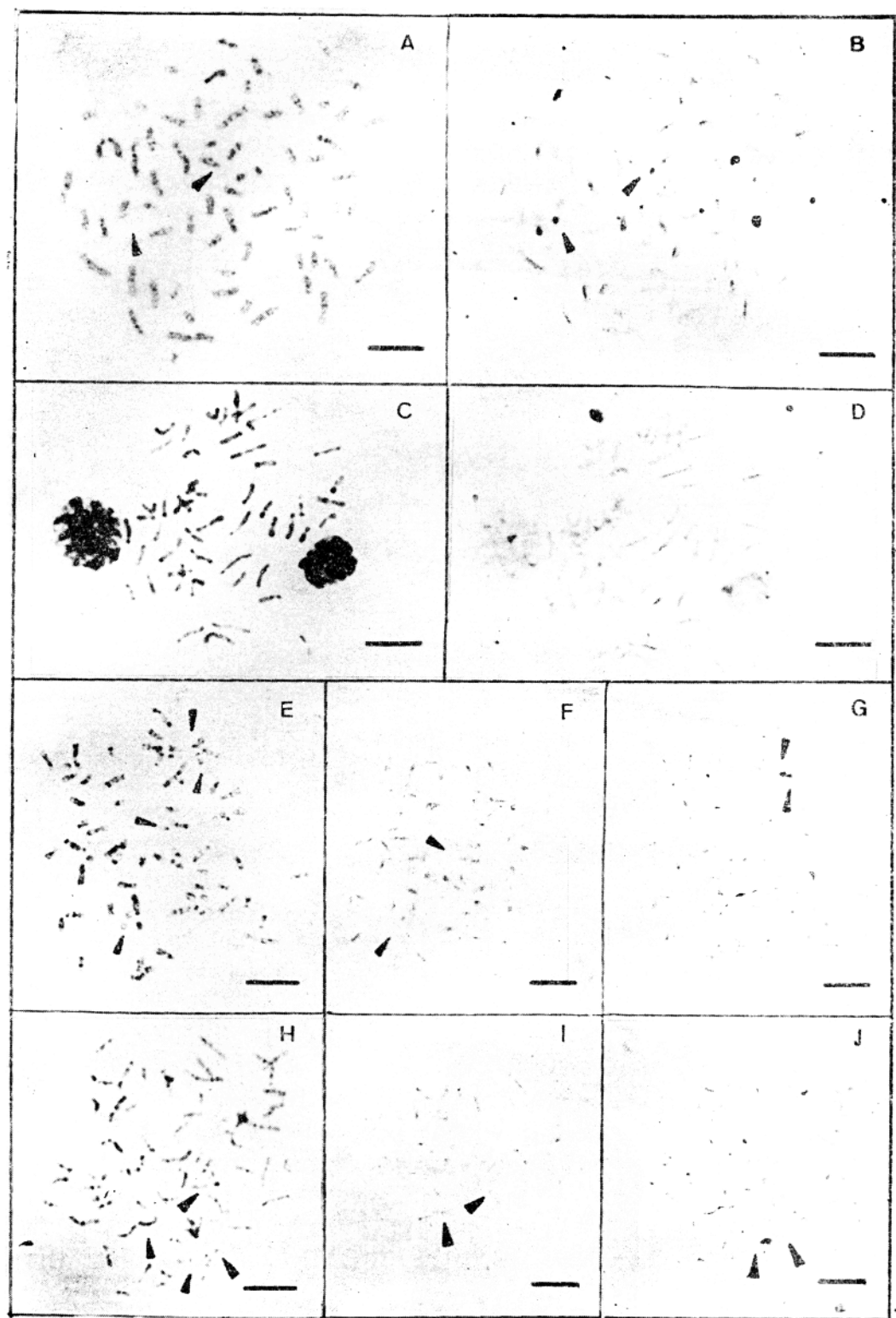
(Faculty of Science, Kwansei Gakuin University, Japan)

Lin Yihao

(Shaoguan City Fisheries Research Institute of Guangdong Province)

Abstract

A new technique to sequentially reveal different banding, including high resolution B-or BG-banding, C-banding and NORs, on the same mitotic figure of fish chromosome is reported. High resolution B-or BG-banding was as in case of Lin, Y.-H. et al. (1987) first, and then C-banding followed the method of Sumner, A.T. (1972), for detecting NORs, the Ag-As technique (Bloom, S.E. et al., 1976) was eventually employed. The results showed that the same mitotic figure of chromosomes in 3 species of experimental fishes, after using them to make the high resolution B- or BG-banding, all could be observe for C-banding or NORs and sequentially revealed C-banding and NORs. In *Synodontis nigriventris*, the two chromosomes that of peculiar NORs staining, 5-8 bands appeared in the high resolution B-or BG-banding. The others two chromosomes that of intense of C-banding, 3-8 bands appeared in the high resolution B-or BG-banding.



(图一)

图1. *Synodontis nigriventris*和*Hemibarbus labeo*的同一中期分裂相的连续多重显带。各图的比例尺代表10 μ 。箭头示C带深染和NORs。

A和B: *S. nigriventris* (2n=68) 同一分裂相的高分辨BG显带和NORs; C和D: *H. labeo* (2n=50) 同一分裂相的高分辨B显带和C显带; E、F和G: *S. nigriventris* 同一分裂相的高分辨BG显带、C显带和NORs; H、I和J: *S. nigriventris* 同一分裂相的高分辨B显带、C显带和NORs。

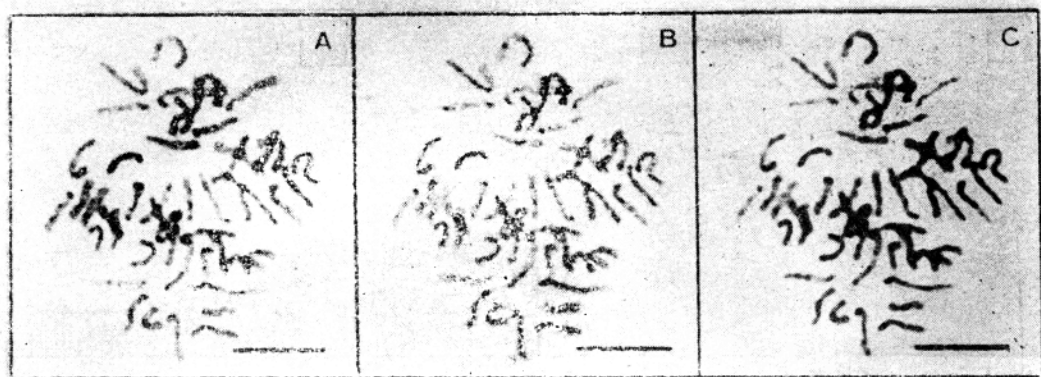


图2. *Rhodops morioekae*同一中期分裂相的高分辨B显带、高分辨BG显带和普通染色。图中的比例尺代表10 μ 。

A: 高分辨B显带; B: 高分辨BG显带; C: 普通染色。

制备小型鱼类染色体标本的PHA二次注射法

林 义 浩

小 岛 吉 雄

(广东省韶关市水产研究所)

(日本国关西学院大学理学部)

摘 要

本文提出适于小型鱼类染色体标本制备的PHA二次注射法。PHA注射剂量为0.01—0.02ml/g(体重),第一次注射后18—20小时以同一剂量作第二次注射,此后经过5—6小时取出肾脏供染色体标本制作。供试鱼4种,体重0.8—2.5g,肾细胞有丝分裂指数分别为 $10.97 \pm 1.22\%$ (*Brycinus longipinnus*)、 $6.95 \pm 1.72\%$ (*Puntius conchoni*)、 $5.70 \pm 1.47\%$ (*Astronotus ocellatus*)和 $6.64 \pm 1.39\%$ (*Jordanella floridae*)。在其他的10余种鱼也得到满意的结果。这一方法简便、可靠,尤其适用于小型鱼类的染色体标本制备。

小型鱼类或鱼苗的染色标本制备虽可采用鳍培养法,但耗时长,一般需要数日,且组织培养设备必不可少。在实验材料充裕,容易得到相当数量实验鱼的情况下,直接从活体制备标本进行染色体考察则更为便利。为了获得良好的染色体标本,Wallin and Gustavsson(1969)对供试鱼作绵羊红细胞注射,以促进脾脏细胞的分裂增殖;Ojima and Kurishita(1980)注射马血清,诱发鱼类肾脏细胞分裂指数的提高;林义浩(1982)采用PHA一次注射刺激鱼类肾脏细胞迅速分裂增殖,在数小时内便可获得大量分裂相。但是,小型鱼类或鱼苗肾脏组织很少,经PHA一次注射得到的分裂相为数不多。因此,本文改PHA一次注射为二次注射,进一步促进肾脏细胞的分裂增殖,获得满意的结果。

材 料 与 方 法

供试鱼为Curimatidae科的*Brycinus longipinnis*, Cyprinidae科的*Puntius conchoni*, Cichlidae科的*Astronotus ocellatus*和Oryziidae科的*Jordanella floridae*4种,购自日本神户的观赏鱼商店。体重0.8—2.5克。PHA二次注射制备染色体标本的过程如下:

1. PHA注射

自实验鱼胸鳍基部以每克鱼体重0.01—0.02ml的剂量作PHA(Difco产品)第一次注射,18—20小时后以相同剂量作PHA第二次注射,继续作用5—6小时。

2. 秋水仙素处理

第二次PHA注射后3—4小时注射秋水仙素,注射部位也为胸鳍基部,注射剂量每克鱼体重0.1—0.2 μ g。秋水仙素注射后1.5—2.0小时处死实验鱼,取出肾脏组织,制成细胞悬液。如需进行同一个体的鳍培养,则不作秋水仙素注射,而将秋水仙素直接加入细胞悬液,终浓度0.01—0.02 μ g/ml(细胞悬液),处理1.5—2.0小时。

3. 染色体标本制作和细胞有丝分裂指数统计

上述细胞经0.0375MKCl低渗处理20—30分钟,3:1的甲醇—冰醋酸固定液三次固定,按通常的空气干燥法制成染色体标本。细胞有丝分裂指数以分裂细胞占计数细胞总数的百分数表示,每一个体统计的细胞数不少于1000。

结 果 与 讨 论

PHA二次注射有效地提高了细胞有丝分裂指数。4种供试鱼实验组及其对照各组细胞有丝分裂指数的统计结果列于表1。由表可知,B.*longipinnis*实验组(PHA二次注射组)的细胞有丝分裂指数达 $10.97 \pm 1.22\%$,为其对照I组(PHA一次注射组)的3.41倍。其对照II组(不作PHA注射组)观察到的分裂相极少,细胞有丝分裂指数仅为 $0.10 \pm 0.10\%$ 。其他3种供试鱼P.*conchonius*, A.*ocellatus*和J.*floridae*实验组的细胞有丝分裂指数为

表1 4种供试鱼实验组及其对照各组肾细胞有丝分裂指数的比较

鱼 别	体重(g)	平均肾细胞有丝分裂指数		
		$\bar{X} \pm S\%$ (实验鱼个体数)		
		实验组 ¹⁾	对照I组 ²⁾	对照II组 ³⁾
Brycinus longipinnis	1.0—1.6	$\frac{10.97 \pm 1.22}{(4)}$	$\frac{3.22 \pm 0.80}{(4)}$	$\frac{0.10 \pm 0.10}{(2)}$
Puntius conchonius	0.9—1.4	$\frac{6.95 \pm 1.72}{(3)}$	$\frac{2.65 \pm 0.65}{(3)}$	$\frac{0.10 \pm 0.10}{(2)}$
Astronotus ocellatus	1.2—2.5	$\frac{5.70 \pm 1.47}{(4)}$	$\frac{1.45 \pm 0.30}{(4)}$	$\frac{0.00 \pm 0.00}{(2)}$
Jordanella floridae	0.8—1.4	$\frac{6.64 \pm 1.39}{(4)}$	$\frac{0.80 \pm 0.14}{(4)}$	$\frac{0.05 \pm 0.16}{(2)}$

1): PHA二次注射组; 2): PHA一次注射组; 3): 不作PHA注射组。

.95±1.72%, 5.70±1.47%和6.61±1.39%, 分别为其对照 I 组的2.62, 3.93和8.55倍。其对照 I 组的细胞有丝分裂指数则分别为0.10±0.10%, 0.00±0.00%和0.05±0.16%。采用以上方法, 获得了大量形态清晰、长度适中、分散良好的中期分裂相(图1. A—E)。此外, 我们在Characidae科的*Hemigrammus ocellifer*, *Serrasalmus nattereri*, Cyprinidae 科的*Carassius auratus*, Mochokidae科的*Synodontis nigriventris*和Toxotidae科的*Toxotes jaculator*等10余种鱼采用以上方法也获得满意的结果(图1. F—J)。

作为一种有丝分裂刺激剂, PHA能够刺激体外培养鱼类肾细胞的分裂增殖(Yamamoto等, 1973), PHA一次体内注射, 同样也能够刺激鱼类肾细胞的分裂增殖(林义浩, 1982)。作者考察了草鱼PHA一次注射后不同作用时间内肾细胞有丝分裂指数的动态变化。在PHA一次体内注射情况下, 草鱼肾细胞分裂增殖的第一个高峰在PHA注射后3—6小时出现, 第二个高峰出现在PHA注射后23—26小时¹⁾。据此, 本文在第二次PHA注射后5—6小时, 即距第一次PHA注射后23—26小时取出肾组织供染色体标本制作, 有利于得到较高的细胞有丝分裂指数。

本文方法简便、快捷、可靠, 不需经过体外细胞培养也能获得良好的染色体标本。如有必要对同一个体的染色体进行连续观察, 可将秋水仙素直接加入细胞悬液, 不作体内注射, 并不妨碍供试鱼培养的同时进行。

参 考 文 献

林义浩, 1982. 水产学报, 6(3):201—208.

Yamamoto, K. and Y. Ojima, 1973. Jpn. J. Genet., 48:235—238.

1): 林义浩等, 1984, 全国草鱼病研究学术讨论会论文汇编(中国科学院水生生物研究所编), 72—78页。

A METHOD OF PHA INJECTION TWO TIMES IN VIVO FOR THE CHROMOSOME PREPARATION FROM THE SMALL KIND OF FISHES

Lin Yihao

(*Shaoguan City Fisheries Research Institute of Guangdong Province*)

Yoshio Ojima

(*Faculty of Science, Kwansei Gakuin University, Japan*)

A new method for inducing fish chromosome divisions by PHA injection two times in vivo is proposed. The quantity of PHA injection was 0.01-0.02ml/g (body weight) in each time. After 18 to 20 hr. of the first PHA injection, the second was injected. 5 to 6 hr. after the second PHA injection, the kidney cells were taken out for preparing chromosome slides. About 15 species of fishes were examined in the present experiment, all giving satisfactory results. In *Brycinus longipinnis*, the average mitotic index of kidney cells reached $10.97 \pm 1.22\%$. This method has twin advantages as being simple and reliable, and particularly adaptable for the small kind of fishes and juvenile fishes.