

鱼类遗传与育种学

实验实训指导教程

Yulei Yichuan Yu Yuzhongxue
Shiyan Shixun Zhidao Jiaocheng

主 编 邹远超
副主编 齐泽民



科学出版社

鱼类遗传与育种学实验 实训指导教程

主 编：邹远超

副主编：齐泽民

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

按照“鱼类遗传与育种学实验”教学改革的要求,本教材主要由两部分组成:第一部分为基础实验部分,主要包括细胞遗传学实验和分子遗传学实验,由8个实验组成;第二部分为应用性、综合性实践实训部分,主要是进入鱼类育种和繁育基地或企业开展鱼类育种实践,主要包括7个实训案例。上述实验与实训的开展,旨在改变传统鱼类遗传与育种学实践教学中以课程为独立单元开展验证性、演示性的实践教学。通过实施鱼类遗传与育种学课程“课程+基地+企业”一体化教学,构建以应用实践和生产案例为导向的教学模式;形成实践教学的专业系统化;规范学生的实践操作流程;强化学生的专业技能,促进学生实践能力的综合化。

本书可作为相关院校水产养殖专业鱼类遗传与育种学实验指导教材,也可供水产机构和科研单位人员、水产企业养殖生产者参考。

图书在版编目(CIP)数据

鱼类遗传与育种学实验实训教程/邹远超 主编. —北京:科学出版社, 2017.10

ISBN 978-7-03-055262-4

I. ①鱼… II. ①邹… III. ①鱼类-遗传育种-教材 IV. ①S962

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 273496 号

责任编辑:张 展 孟 锐/ 责任校对:王 翔

责任印制:罗 科/ 封面设计:墨创文化

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

成都锦瑞印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017年10月第 一 版 开本:B5 (720×1000)

2017年10月第一次印刷 印张:7

字数:143千字

定价:49.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

项目资助：“四川省水产养殖专业综合改革”（编号：13B004）

“四川省卓越水产养殖专业人才培养试点项目”（编号：14J001）

“农科教合作人才培养实践基地项目”（编号：SJ15002）

本科院校专业(群)转型发展改革试点及校级教改项目“鱼类遗传
与育种学实践教学模式探索”（编号：JG201415~274）

鱼类遗传与育种学创新创业教育示范(CK17002)

内江师范学院本科教学工程项目

鱼类遗传与育种学四川省创新创业示范课程

编 委 会

主 编：邹远超

副主编：齐泽民

编 委：覃川杰 谢碧文 李 斌 陶 敏

王永明 李 锐 文正勇 袁登越

前 言

渔业是我国农业经济的重要组成部分。加快农业科技创新,促进水产健康养殖,健全农业社会化服务体系被写入《中华人民共和国国民经济和社会发展第十二个五年规划纲要》和《全国渔业发展第十二个五年规划》。有“千河之省”美誉的四川,是我国淡水鱼养殖大省,在西部淡水鱼养殖中一直位居前列。渔业经济是四川国民经济的重要组成部分,按照《四川省渔业发展第十二个五年规划》,四川省将建成国家级、省级良种场 55 个,国家级、省级、市级、县级等各类水产龙头企业 367 个,各类专业合作经济组织 513 个,水产技术推广机构 859 个,新农村水产示范园 521 个,防疫站 164 个,鱼类自然保护区和水产种质资源保护区 80 余个,全省水产品总产量将年均递增 3%,从业人员将达 119 万人以上。但管理严重滞后,养殖结构不合理,渔业生产组织化程度不高、创新能力不足,人才队伍构建极不合理(具有本科以上学历的人数不到总人数的 40%)是制约四川水产产业发展的瓶颈。

《四川省渔业发展第十二个五年规划》提出了“转变生产方式,强化渔业创新型和应用型人才培养,加快要素集聚和技术创新,构建现代渔业产业体系”的总体要求,进一步强化水产养殖专业具有创新精神和能力的应用型人才培养是加快现代渔业发展的迫切要求。

为了进一步促进水产养殖专业教育教学改革的深化,强化水产养殖专业学生的职业技能和职业素质,培养具有较高专业实践能力的应用型、复合型、技能型人才,内江师范学院生命科学学院依托四川省“长江上游鱼类资源保护与利用”四川省重点实验室和校企合作共建“中国白乌鳢”研究所校内实践教学平台,依托省级质量工程“水产养殖专业综合改革试点项目”,在人才培养模式、教学团队、课程及教学资源、教学方法、实践实训、教学管理及评价等专业发展重要环节的综合改革初见成效,特别是依托四川省重点实验室与地方企业“产、学、研”合作为核心构建高质量的实践实训基地,科研、创新、创业一体化水产养殖应用型人才培养模式不断完善,人才培养质量不断提高,专业特色逐渐形成,使学生得到企事业单位的好评。

“鱼类遗传与育种学”是水产养殖专业中一门应用性及实践性很强的专业必修课。长期以来,水产动物遗传育种学实验的教学内容一直沿用传统遗传实验项目作为基础性实验(占全部实验项目的 40%~50%),即以鱼类为实验材料的细胞

遗传学和以果蝇为实验材料的经典遗传学，保证学生能较好地掌握该课程的基础知识。目前的实践教学基本上是依附于单一理论课的验证性实验，其特点是操作的演示性、知识的单一性，综合性实验少，设计性实验更少甚至缺失。尽管这些实验也覆盖了研究性和综合性实验项目，用以加强学生实验技能和综合能力培养，但是水产专业特色明显不足，远不能满足学生对专业领域的了解，更不利于专业思想的培养。自 1996 年以鱼类多倍体育种、性别控制育种为代表的水产高新技术纳入国家 863 计划以来已有 18 年(截至 2014 年)，中国海洋大学乃至全国各科研院所在水产生物遗传育种学领域取得了一大批令人瞩目的成果，诞生了“蓬莱红”栉孔扇贝、“海大金贝”虾夷扇贝、“大连 1 号”杂交鲍鱼、“黄海 1 号”中国对虾、“异育银鲫中科 3 号”、“北鲆 1 号”、“北鲆 2 号”、全雄黄颡鱼、全雄罗非鱼、全雌牙鲆、全雌半滑舌鳎等鱼类新品种。这也促使我们不断思考如何将这较为成熟的前沿成果和尖端技术转化为实践教学内容，以创新性实践的方式让学生们了解和掌握。

为了提高该课程的教学质量，提升学生的专业水平，我们对该课程进行了教学改革：将理论课集中在 1~6 周，7~16 周集中在鱼类繁育企业实习或实训(附录)。通过在企业开展鱼类遗传育种学的实习，使学生系统掌握鱼类选择育种、杂交育种、倍性育种、良种繁育等育种学的基本理论和基本方法，并能应用于分析和解决生产中的有关问题。通过在苗种生产企业的实习，可以提高学生专业综合能力，强化学生专业实践操作技能，培养学生综合运用专业知识解决品种选育、良种繁育等生产应用问题的能力。通过课程改革，以期将该课程建设成为教学内容先进、教学形式多样化、教学效果优良的校级或省级精品课程。

本教材是在总结编者长期实践教学工作经验的基础上，广泛吸取兄弟院校水产动物遗传与育种学的宝贵经验，并参阅有关文献资料，进一步整理编写而成的。由于可供参考的资料有限，加之编者水平有限，时间仓促，不当之处在所难免，敬请广大同仁和读者批评指正，我们将不胜感谢。

目 录

第一部分 基础实验部分	1
实验一 鱼类肾细胞染色体标本的制备	1
实验二 鱼类染色体核型分析	6
实验三 鱼类倍性和细胞核 DNA 含量分析	11
实验四 高盐法提取鱼类尾鳍组织基因组 DNA	18
实验五 苯酚-氯仿法提取鱼类肌肉基因组 DNA	23
实验六 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	26
实验七 DNA 的 PCR 扩增及聚丙烯酰胺凝胶电泳	31
实验八 鱼类肌肉组织总 RNA 的提取	38
第二部分 实训部分	43
实训一 鱼类的种质鉴定	43
实训二 鱼类三倍体的人工诱导	50
实训三 鱼类四倍体的人工诱导	58
实训四 多倍体的鉴定——核体积测量法	65
实训五 17 β -雌二醇诱导鱼类雌性化	69
实训六 鱼类雌核发育的诱导及鉴定	74
实训七 不同品系金鱼的杂交与育种	93
附录 “课程+基地+企业” 一体化教学生产实践照片	95

第一部分 基础实验部分

实验一 鱼类肾细胞染色体标本的制备

【实验目的】

- (1)掌握鱼类肾细胞染色体制备的方法和原理。
- (2)了解染色体制备常用试剂及其作用。

【实验原理】

染色体是主要的生物遗传物质载体，其数量、组型、形态都具有其特异性。研究鱼类的染色体，对于鱼类的遗传变异、分类地位、系统演化、性别决定、杂交育种等都具有重要的作用(楼允东，1997)。通过鱼类染色体研究，不仅能了解生物的遗传组成、进化地位及染色体演化过程，而且能对鱼类种质鉴定和遗传育种等提供基础资料和科学依据。

鱼体内小淋巴细胞，通常处在 G_1 期(或 G_0 期)，一般情况下不进行分裂。如在体内注射植物血凝素(PHA)，这种小淋巴细胞受到刺激可转化为淋巴母细胞，进入有丝分裂。短期培养后，经秋水仙素处理、低渗和固定，即可得到大量有丝分裂中期细胞。

【实验材料】

购买于水产鲜活鱼市场的黄颡鱼或匙吻鲟 10 尾暂养于水族箱中，逐步升温至 25°C 饲养备用。

【实验器材】

研钵、电子天平、4 个 1000mL 容量瓶、2 支 10mL 离心管、量筒、小烧杯、培养皿、移液器、培养箱、加热棒、镊子、眼科手术剪刀、1mL 注射器、冰冻离心机、1.5mL 离心管、CCD 照相机、长嘴吸管、显微镜、香柏油、二甲苯、

载玻片 2 盒、载玻片盒 5 个。

【实验药品】

(1)生理盐水：称取 8.5g NaCl 固体溶于 1000mL 双蒸水中，摇匀，配制成浓度为 0.85% 的 NaCl 溶液。

(2)低渗溶液：称取 2.794g KCl 固体溶于 1000mL 双蒸水中，摇匀，配制成浓度为 0.0375mol/L 的 KCl 溶液。

(3)植物血凝素(PHA)溶液：称取 0.007g PHA 粉末溶于 10mL 双蒸水中，摇匀配制成浓度为 0.07% 的 PHA 溶液于 4℃ 冰箱中保存。

(4)磷酸缓冲液(PBS, pH=7.3)：甲液，称取 1.56g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1000mL 蒸馏水中，摇匀；乙液，称取 3.58g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1000mL 蒸馏水中，摇匀；将甲液和乙液以 3 : 7 混合。

(5)Giemsa 母液：称取 0.5g Giemsa 粉，甘油 33mL，先倒少许甘油在研钵中，将 Giemsa 研至无颗粒后，将剩余的甘油倒入研钵中，60℃ 下存放 1.5h 后加入 33mL 甲醇，保存于棕色试剂瓶中(保存时间越长，染色效果越好)。

(6)卡诺固定液：将甲醇与冰醋酸按 3 : 1 的比例混合，现配现用。

(7)秋水仙素溶液：称取 0.03g 秋水仙素粉末溶于 100mL 双蒸水中，摇匀配制成浓度为 0.03% 的秋水仙素溶液于 4℃ 冰箱中保存。

【实验步骤】

1. PHA 和秋水仙素处理

按 $10\mu\text{g/g}$ 鱼体重向鱼体腹腔注射 PHA 溶液，6h 后再向鱼体腹腔注射与第一次相同剂量 PHA 溶液，在 25℃ 水箱中饲养 12h 后按 $5\mu\text{g/g}$ 鱼体重注射秋水仙素溶液，在 25℃ 水族箱中饲养 2.5h。

2. 取材

预期处理后将实验鱼断头放血 5min，放血后取鱼肾脏于 0.85% 的生理盐水中洗涤，去结缔组织后放于 2mL 离心管内用眼科手术剪尽量将组织块剪碎。剪碎后用长嘴吸管吹打数次使细胞分散，吹打时力度不可过大以免将细胞悬液溢出。吹打结束后静置 5min 使组织块沉淀，吸取细胞悬液于另一干净离心管中，60000r/min 离心 15min。

3. 低渗

弃上清液，加入适量 0.0375mol/L KCl 溶液(预热 37℃ 的低渗液)，用手轻

轻击打离心管底部,利用回旋力将细胞打散,力度要轻,以免细胞破裂。击打均匀后将其放入 37°C 烘箱中低渗处理 120min,其间,反复吹打多次。低渗结束后, $60000\text{r}/\text{min}$ 离心 20min。

4. 固定

弃上清液,收集细胞加少许新配置的卡诺固定液,将细胞击打散后再加入适量卡诺固定液,固定 30min,固定结束后 $60000\text{r}/\text{min}$ 离心 15min。重复固定 3 次。

5. 制片染色

弃上清液,加入新配制的卡诺固定液 8 滴,将细胞击打均匀。冰冻玻片倾斜 45° 放置,在距离玻片高 50cm 左右滴片,每片滴 2~3 滴,不能重叠滴加,空气自然干燥。干燥后将磷酸缓冲液($\text{pH}=7.3$)与 Giemsa 母液按 9:1 混合制成染液(现配现用),每片玻片滴加数滴染液,染色 30min。染色后用自来水冲洗(冲洗玻片背面),自然干燥后观察。

6. 染色体观察

在油镜下选取来自同一地区不同个体的 50~100 个分散良好、形态清晰、数目完整的中期分裂象,用 Optimas 软件系统手工统计每个分裂象的染色体数目,并进行显微摄影。二倍体黄颡鱼肾细胞染色体众数为 $2n=52$,即为该地区黄颡鱼染色体的倍性(图 I-1-1)。二倍体匙吻鲟肾细胞染色体众数为 $2n=120$,即为该地区匙吻鲟的染色体的倍性(图 I-1-2)。

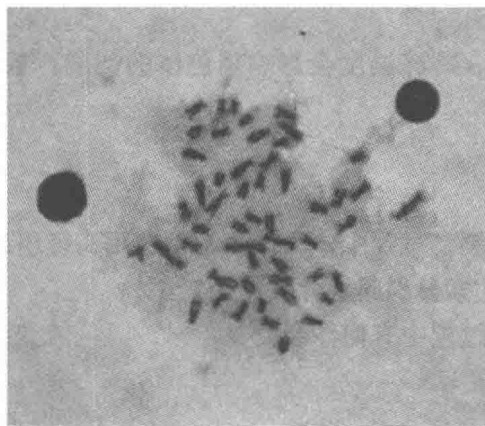


图 I-1-1 黄颡鱼肾细胞染色体中期分裂象($2n=52$)

比例尺为 $10\mu\text{m}$

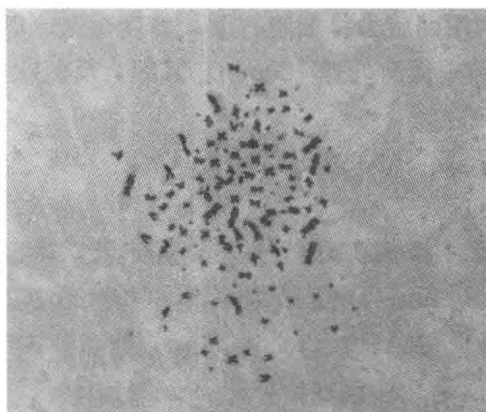


图 I-1-2 匙吻鲟肾细胞染色体中期分裂象($2n=120$)

比例尺为 $10\mu\text{m}$

【注意事项】

(1)秋水仙素处理时间过长,分裂细胞多,染色体短小;反之,则少而细长,都不宜观察形态及计数。故秋水仙素的浓度及处理时间要准确掌握。秋水仙素一定要避光保存,配制后使用期不能超过半年。

(2)低渗的时间、温度会影响染色体的分散和分裂象的数目。低渗使红细胞膜破裂,淋巴细胞膨胀,低渗处理浓度及时间要适当,且低渗后混匀细胞一定要轻,否则会引起膜破裂、染色体散失。

(3)离心前配平,离心速度过高,细胞团不易打散;反之,细胞易丢失。

(4)固定液一定要现用现配,固定要彻底,每次不少于 30min,加固定液不能过快,要沿管壁慢慢加入,否则染色体容易扭转;固定作用不足,染色体出现毛刷状。

(5)玻片的清洁度、冷冻温度会影响染色体的铺展;载玻片一定要洁净,否则染色体分散不好。

【实验作业】

- (1)在鱼类染色体制备过程中,为什么常常选用头肾组织来制备染色体标本?
- (2)PHA 和秋水仙素分别起了什么作用?
- (3)在染色体制备过程中有何体会?

【主要参考文献】

- 桂建芳,李渝成,李康,等,1986. 中国鲤科鱼类染色体组型的研究. 鱼类学论文集: 119-126.
- 韩荣成,岳永生,姜中伸,2003. 鱼类染色体核型分析方法概述. 水利渔业, 23(5): 38-40.
- 李树深,1980. 脊椎动物的多倍体. 动物学杂志, 25(2): 52-54.
- 李树深,王蕊芳,刘光佐,等,1983. 八种淡水真骨鱼类的核型研究. 遗传, 5(4): 25-28.

楼允东, 1997. 中国鱼类染色体组型研究的进展. 水产学报, 21: 82-84.

小岛吉雄, 1991. 鱼类细胞遗传学. 林义浩译. 广州: 广东科技出版社: 6-13.

张伟明, 吴萍, 吴康, 等, 2003. 两种鱼类染色体制片方法的比较研究. 水利渔业, 23(5): 9-10.

实验二 鱼类染色体核型分析

【实验目的】

- (1)学习染色体核型分析的方法。
- (2)掌握显微摄影及图像处理技术。

【实验原理】

各种生物染色体的形态、结构和数目都是相对稳定的,如人类体细胞中共有 23 对染色体,包括 22 对常染色体,1 对性染色体。一个物种的染色体数目及形态特征称为该物种的核型(karyotype),包括染色体数目(即基数)、形态、大小、着丝点位置及次缢痕和随体的有无等。对这些特征进行定量和定性的描述,就是核型分析(karyotype analysis)。染色体核型分析是染色体研究的一个基本方法,它对研究生物系统演化、物种之间的亲缘关系、起源、进化与分类、远缘杂交及遗传工程中的染色体鉴别都有重要意义。

染色体核型分析通常包括如下指标。①染色体数目:一般以体细胞染色体数目为准,至少统计 5~10 个个体,以 30 个以上细胞的染色体数目为宜。在个体内出现不同数目时,则应该如实记录其变异幅度和各种数目的细胞数或百分比,而以众数大于 85%者为该种类染色体数目。②染色体绝对长度:即用测微尺直接在显微镜下测量实际长度(μm),或经显微摄影后在放大照片上换算长度,由于染色体制片中很多因素影响染色体绝对长度,绝对长度往往不稳定。③染色体相对长比:指单个染色体的长度占单套染色体组(性染色体除外)总长度的百分数。核型分析中常采用相对长度。相对长度=单条染色体长度/单倍染色体长度 $\times 100$ (精确到 0.01),将两条同源染色体的相对长度进行平均,作为染色体组中这一序号的染色体的相对长度。④臂比:一条染色体两条臂长度的比值。臂比=长臂/短臂(精确到 0.01)。⑤着丝粒位置:现在最常用的着丝粒命名法是 Levan 等(1964)提出的两点四区系统,其规定如表 I-2-1 所示。⑥次缢痕及随体:次缢痕的有无及位置,随体的有无、形状和大小都是重要的形态指标,也应仔细观察记载。带随体的染色体用“SAT”或“*”标记。

染色体在复制后,细胞内的染色单体之间通过着丝粒连接,由于着丝粒的位置不同,可以将染色体分为相等或不等的两臂,形成不同的染色体形态。所有这

些染色体的特异性构成一个物种的染色体组型。染色体核型分析是细胞遗传学、现代分类学和进化理论的重要研究手段，也是简便的方法。无论是在植物还是动物研究方面，以往的学者都在核型分析上进行了大量的工作。

表 I -2-1 染色体分组标准

臂比(长臂/短臂)	形态特征
1~1.7	中部着丝粒染色体
1.71~3.0	亚中部着丝粒染色体
3.01~7.0	亚端部着丝粒染色体
>7.01	端部着丝粒染色体

细胞分裂中期是染色体形态结构最典型的时期，通过显微镜摄影，将选取伸展良好、形态清晰、有代表性的细胞分裂相进行高倍拍摄放大，得到照片，该核型可以代表该个体的一切细胞的染色体组成。

根据染色体玻片标本和染色体照片的对比分析，进行染色体分组，并对组内各染色体的长度、着丝粒位置、臂比和随体有无等形态特征进行观测和描述，从而阐明生物的染色体组成，确定其染色体组型，这种过程称为染色体组型分析。染色体组型分析也称核型分析。

染色体长度测定：可在显微镜下用测微尺直接测量或在放大的照片上测量得到，通常以微米表示。

绝对长度：不稳定，只有相对意义。

相对长度：是单条染色体的绝对长度与正常细胞全部染色体总长度的比值，通常用百分比表示，是稳定的、比较可靠的数据。

着丝粒的位置：常用 Levan 提出的方法，即以染色体的长臂和短臂的比值来表示。

【实验材料】

黄颡鱼或匙吻鲟肾细胞的染色体照片复印件，每人一张。

【实验器材】

Photoshop CS4 软件、镊子、剪子、直尺、计算器、胶水。

【实验步骤】

1. 传统方法

(1)确定染色体数目： $2n=100$ 。

(2)将照片上的每条染色体进行随机编号。

(3)测量每一条染色体的长臂、短臂长度,随体长度不计入染色体长度,但需标注随体染色体的编号;算出染色体的全长(长臂+短臂)和臂比值(长臂/短臂)。

(4)配对:根据所测数据结合目测,按次缢痕的有无和位置、随体的形态和大小、染色体的形态及大小、臂比值、染色体长度是否相等将同源染色体配对。

(5)计算同源染色体中两条染色体长、短臂及总长的平均值,并把这些数值换算成相对长度。

$$\text{相对长度} = \frac{\text{某染色体的长度}}{\text{染色体组内全部染色体总长度}}$$

$$\text{臂比值} = \frac{\text{长臂长度}(q)}{\text{短臂长度}(p)}$$

$$\text{着丝点指数} = p / (p + q)$$

(6)排队:将同源染色体对按一定原则排队,并编号。

2. 用 Adobe Photoshop 进行核型分析

(1)染色体随机编号:打开 Photoshop 软件,鼠标左键点击文件按钮→打开→选择要打开的染色体图片→鼠标左键点击左侧横排文字工具(T)→选择横排文字工具对染色体进行编号。

(2)测量:鼠标左键点击视图→选择标尺→选择单位(mm)→鼠标左键点击分析(A)按钮→选择标尺工具测量长臂、短臂。实际长度换算如下:

染色体臂长的实际长度=测量长度×比例尺实际长度/比例尺测量长度

例如:该染色体臂长的测量长度为 59.65mm,比例尺(10mm)测量长度为 149mm,则染色体臂长的实际长度=59.65mm×10mm/149mm=0.65mm。

(3)配对:根据目测和染色体相对长度、臂比、着丝粒位置,以及次缢痕的有无及位置,随体的有无、形状及大小等特性将同源染色体配对。

(4)剪裁:将同源染色体配对后根据中部、亚中部、亚端部及端部着丝粒等类型,按由大到小的顺序使用套索工具对染色体进行剪裁,可选择多边形套索。

多边形套索:①左键点击软件左侧工具栏中套索工具→选择多边形套索,进行随机裁剪;②新建图层,点击软件上方文件按钮→选择新建图层→选择图像大小→确定;③染色体移动,将裁剪好的染色体复制(Ctrl+C)粘贴(Ctrl+V)到新建图层当中;④染色体位置校正,点击软件上方编辑→变换→旋转对裁剪好的染色体进行位置校正;⑤剪裁,点击左侧缩放工具将待裁剪染色体进行放大处理→点击软件左侧矩形选框工具选择染色体→鼠标放在染色体处点击右键选择反向→鼠标左键点击左侧橡皮擦工具→将边框周围处理干净→再次选择反向→点击左侧移动工具将染色体移动;⑥染色体编号,按照染色体编号将软件右侧图层更改成相应染色体编号+着丝粒类型,方便以后修改;⑦排列,点击移动工具从标尺处

(视图→标尺)拉取若干条校准线对染色体位置进行固定，按照中部着丝粒、亚中部着丝粒、端部着丝粒从大到小进行分类排列。图 I -2-1 和图 I -2-2 分别为黄颡鱼和匙吻鲟的肾细胞染色体核型。

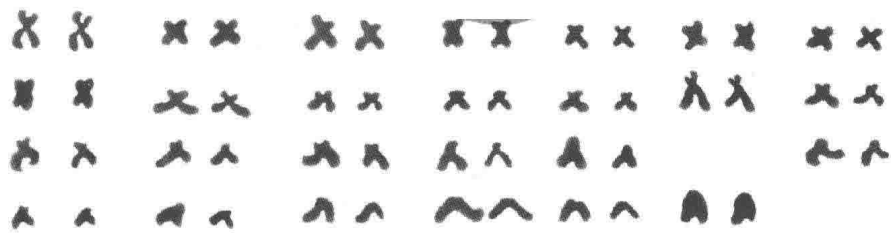


图 I -2-1 黄颡鱼肾细胞染色体核型($2n=24m+14sm+14st,t$)

比例尺为 10mm

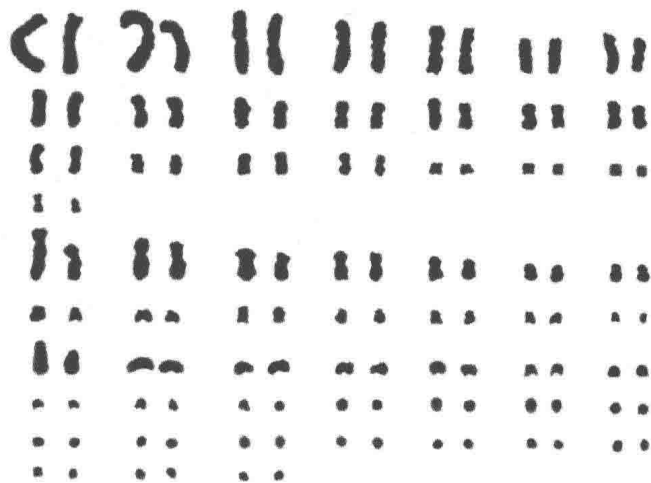


图 I -2-2 匙吻鲟肾细胞染色体核型($2n=44m+32sm+44st,t$)

比例尺为 10mm

【注意事项】

- (1)按染色体大小相近及着丝粒位置相同进行分组排列。
- (2)染色体长的在前，等长的染色体短臂长的在前。
- (3)大随体染色体在前，小随体染色体在后。

【实验作业】

- (1)粘贴一张鱼类肾细胞的染色体核型图。
- (2)完成表。