

BrdU-Hoechst-Giemsa 方法的进一步改进 以及青鱼和草鱼复制带核型的研究*

桂建芳** 周 曦

(武汉大学生物系)

提 要

对 BrdU-Hoechst-Giemsa 方法进行了一定的改进和补充;并将它应用于青鱼和草鱼的核型研究中。实验进一步阐明, BrdU-Hoechst-Giemsa 方法的关键性步骤之一是要先测算实验鱼的细胞周期; BrdU、AMD、Hoechst 33258, EB 和 AO 虽都有抑制鱼类染色体浓缩、促进染色体分带的作用,但其中以 DNA 碱基特异性给合物 BrdU、AMD 和 Hoechst 33258 较佳,特别用 AMD 和 Hoechst 33258 同时处理活细胞的分带效果最好。

鱼类核型研究的发展和深入,迫切需要染色体分带技术的应用。自 70 年代中期以来,已有不少学者致力于鱼类染色体分带研究,但收效甚微。迄今为止,除 C 带和 Ag-NOR 带已获得了一些成功的报道之外^[6,8,11], G 带和 Q 带也有报道^[7,11],但带纹不够清晰,难于分析。最近,周曦(1984)^[3]和洪云汉等(1985)^[4]把 BrdU-Hoechst-Giemsa 方法应用于鱼类获得了较清晰的复制带图象,为显示鱼类染色体的多重带型(multiple banding pattern)提供了新的手段。我们在此基础上,进行了一些改进和补充,并用它分析了青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的复制带核型。

材 料 与 方 法

青鱼 2 尾(♂)、草鱼 3 尾(♂)均采自武汉市大东门市场。

我们直接将 BrdU-Hoechst-Giemsa 方法用于青鱼和草鱼,未能获得理想结果。但发现处理 18 小时后有少数细胞出现姐妹染色单体分化染色(sister chromatid differential staining, SCD),也就是说,有少数细胞在 BrdU 掺入后已复制了两个细胞周期。这一发现启发了我们的思路,是不是这些鱼类细胞周期的长短不同呢?接着,我们用鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)作为对照,与青鱼和草鱼同时培养,并把培养细胞分为几组,将 BrdU 处理时间依次改为 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 和 21 小时,一般是在细胞培养 51—60 小时加入 BrdU(终浓度 10 微克/毫升),72 小时前后收获。终止培养前

* 本工作是在余先觉教授指导下进行的;经费由中国科学院科学基金委员会资助,谨此一并致谢。

** 现在工作单位:中国科学院水生生物研究所。

1985 年 3 月 6 日收到。

1—1.5 小时加入放线菌素 D (actinomycin D, AMD) (终浓度为 2 微克/毫升) 和秋水仙素(终浓度为 0.05 微克/毫升)。除此之外,我们还分别用 Hoechst 33258 (终浓度为 5 微克/毫升和 10 微克/毫升)、AMD (终浓度为 2 微克/毫升)、溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) (终浓度为 10 微克/毫升)、吖啶橙 (acridine orange, AO) (终浓度为 10 微克/毫升) 代替 AMD 处理培养细胞,其处理时间及秋水仙素使用的浓度同于 AMD 处理。

常规空气干燥法制片。

分带程序同周嘤^[3] 和洪云汉等^[4] 的报道。

结果与讨论

1. 鱼类的细胞周期与 BrdU 最佳处理时间的选择

对照试验发现,白鲢和鳙鱼一般在 BrdU 处理 20—21 小时时,少数中期相才出现 SCD 染色,处理 18 小时时,分带效果最佳,与洪云汉等^[4] 报道的结果相同;而青鱼和草鱼在 BrdU 处理 18—19 小时时,就可观察到呈现 SCD 染色的中期相,20 小时以后,呈现 SCD 染色的中期相明显增多,在 BrdU 处理 14—15 小时时,分带效果最佳。

上述结果表明,不同鱼类的肾培养细胞的细胞周期长短不同,因而 BrdU 的处理时间与实验鱼细胞周期的长短密切相关。根据工作中的经验,在应用 BrdU-Hoechst-Giemsa 方法进行鱼类染色体的复制带分带时,关键性的第一步就是要测算实验鱼的细胞周期的长短,即将 BrdU 处理时间稍微延长到 17—20 小时左右,寻找出最早出现 SCD 的 BrdU 处理时间,然后将此时间减少 3 个小时左右,就能比较顺利地找到分带效果最好的 BrdU 处理时间。另一方面,在摸索方法阶段,将 BrdU 处理时间延长一些,还可根据 SCD 的出现与否来判断 BrdU 处理、各种试剂处理和紫外光照射等分带步骤的有效程度。

2. BrdU、AMD、Hoechst 33258、EB 和 AO 都有抑制鱼类染色体浓缩促进分带的作用

AMD 能抑制鱼类染色体浓缩拉长染色体^[4],我们在青鱼和草鱼中获得了同样的结果。并进一步发现,用 Hoechst 33258、EB 或 AO 代替 AMD,也能达到抑制鱼类染色体浓缩拉长染色体的作用;尤其是将 AMD 和 Hoechst 33258 同时处理活细胞,其效果更为显著,青鱼和草鱼的复制带核型就是根据这一处理所获得的复制带中期相而排出的(图 1,2)。用 EB 或 AO 处理,染色体伸展得更长,带纹更细,呈现有高分辨带的雏形。但特征性不强,难于分析,且分裂指数明显降低,染色体形态欠佳,扭曲和重叠比较厉害。

一般认为,鱼类染色体多重带分带困难的原因主要是鱼类染色体小、过度浓缩和染色体碱基成分分布的区域性差异较弱等。因此,抑制染色体过渡收缩而拉长染色体和扩大染色体纵向结构差异是进行鱼类染色体多重带分带的关键。AMD、Hoechst 33258、EB 和 AO 都具有抑制染色体收缩而促使染色体伸长的作用,近年来被广泛用之于人类和其它脊椎动物染色体的高分辨带型的研究。AMD 是与 GC 碱基对特异性相结合的物质,它通过嵌到 GC 碱基序列之中而抑制染色体收缩^[13];Hoechst 33258 是与 AT 碱基对特异性相结合的物质,它对染色体上富含 AT 碱基簇 (base clusters) 的区段具有特异拉长的作

用^[12]; EB 和 AO 不是碱基特异性结合物,它们对整个染色体的抑制作用是均一的,因而染色体均等伸长,呈现出多而细的高分辨带^[9,10],但特征性比用 AMD 或 Hoechst 33258 所获的结果差。从我们的试验中也可看出,用 AMD 和 Hoechst 33258 分别处理或用 AMD 和 Hoechst 33258 同时处理所获得的结果比用 EB 或 AO 处理所获的结果较为理想,前者带间距离 (interband) 较长,特别是着丝粒区域明显伸长,分辨率较好,后者带间距离短,分辨率较差。因此我们认为,在进行鱼类染色体多重带分带时,最好选用 AMD 和 Hoechst 33258 等能与 DNA 碱基特异性相结合的物质处理活细胞。

就鱼类染色体复制带分带的 BrdU-Hoechst-Giemsa 方法来说,关键的还是 BrdU 的作用。它是 T 的类似物,可代替 T 而掺入 AT 碱基对区域,由于其对紫外光非常敏感,再加上 Hoechst 33258 与其特异性结合更增加了它们对紫外光的敏感性,从而使得染色体上富含 AT 碱基区段优先变性而着色很浅或难以着色而呈现出复制带带纹^[14]。我们用 Hoechst 33258 处理活细胞,除了利用 Hoechst 33258 有抑制染色体收缩特异性拉长富含 AT 碱基区段的作用外,另一主要作用就是使它在活细胞阶段就特异性地嵌合到已掺入了 BrdU 的区段而导致优先变性,以提高带纹的反差。BrdU 有抑制染色体收缩的作用,使得掺入了 BrdU 富含 AT 碱基簇的区段特异伸长^[12],扩大了鱼类染色体纵向结构的差异。

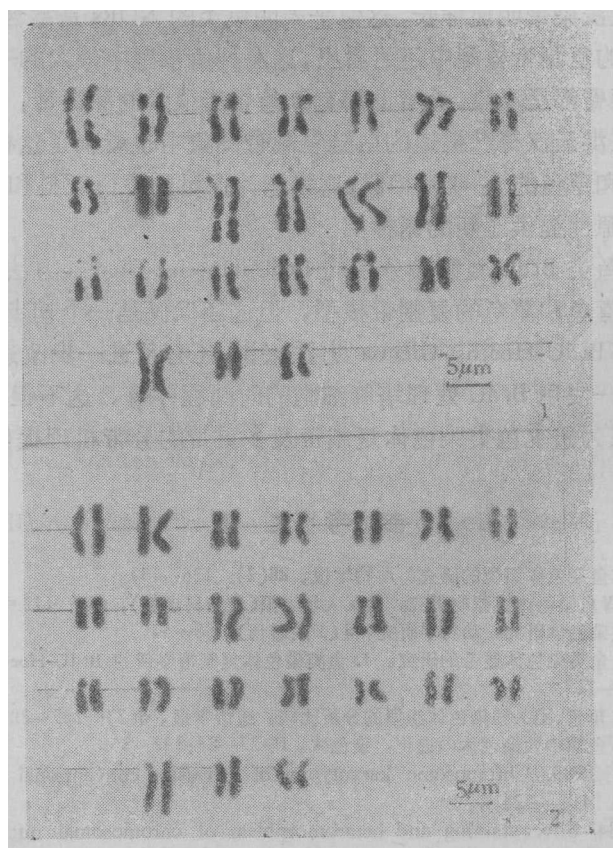


图 1,2 青鱼和草鱼 BrdU 复制带核型

Fig. 1,2 The BrdU-replication band karyotype of *Mylopharyngodon piceus* and *Ctenopharyngodon idellus*.

3. 青鱼和草鱼的复制带核型

草鱼的核型已作过多次报道。管瑞光等 (1979)^[5] 的分析结果为 $18m + 22sm + 8st$, $NF = 88$; 刘凌云 (1980)^[1] 的分析结果为 $16m + 32sm$, $NF = 96$; 李渝成 (1982, 武汉大学研究生毕业论文) 的分析结果为 $18m + 24sm + 6st$, $NF = 90$ 。我们在排列复制带核型时, 发现按照李渝成分析的结果比较合适。青鱼的核型, 周瞰等 (1980)^[2] 已作过报道, 但那时没有将 sm 组和 st 组分开, 其核型公式是 $14M + 34S(sm, st)$ 。我们参照有关核型分析的数据 (凌均秀, 1981, 武汉大学研究生毕业论文) 和根据复制带图象的分析, 发现青鱼的核型组成与草鱼一致, 也是 $18m + 24sm + 6st$ 。按照上述的核型组成, 分别从青鱼和草鱼的复制带图象中选择一个分带效果较好且染色体形态较佳的中期相排出它们的复制带核型 (图 1, 2)。

从图 1, 2 可以看出, 青鱼和草鱼的染色体复制带具有较明显的特征, 同源染色体之间的带纹基本一致, 每对染色体都有其特定的带型, 基本上能准确地一一配对; 几乎每一染色体的着丝粒区域都呈浅染, 且明显伸长, 表明青鱼和草鱼染色体的着丝粒区域为 AT 碱基簇分布区, 因而掺入了大量的 BrdU 而被拉长并浅染; 结合我们对银染核型的分析¹⁾, 从草鱼的复制带核型中可以看出, sm_{11} 和 st_3 短臂上呈现 Ag—NOR 带的区域在复制带核型中表现为浅染带, 且浅染带明显伸长, 这似乎表明鱼类的 NORs 是富含 AT 碱基的区域。

从青鱼和草鱼的复制带核型中还可看出, 这两种鱼核型中最大的一对染色体 st_1 具有明显的同源性, 其短臂都呈浅染, 长臂上都有 2 条相连很紧的深染带, 长臂末端都有 2 条小的深染带; 我们在洪云汉等^[4] 报道的白鲢复制带图象中也看到了这样的一对染色体, 其形态和带型与青鱼和草鱼的 st_1 非常相似, 这可能为探讨雅罗鱼亚科和鲢亚科鱼类的核型演化以及核型的同源性提供了新的指标。

本文虽然对于鱼类 BrdU 复制带分带的 BrdU-Hoechst-Giemsa 方法作了一定的改进和补充并用之分析了青鱼和草鱼的复制带核型, 但这还仅仅是一个初步的尝试, 尚待于更加全面的研究。就 BrdU-Hoechst-Giemsa 方法来说, 还必须进一步改进和发展, 如加强同步化培养措施和统一使用 BrdU 处理培养细胞的时间程序等, 这不但可以提高染色体标本的质量, 而且可以为研究鱼类染色体复制带及多重带的分带机理提供更多的科学资料。

参 考 文 献

- 【1】 刘凌云, 1980. 草鱼染色体组型的研究. 动物学报, **26**(2): 126—131.
- 【2】 周瞰等, 1980. 青鱼染色体组型的研究. 武汉大学学报(自然科学版), (4): 112—116.
- 【3】 周瞰, 1984. 鱼类染色体研究. 动物学研究, **5** (1期增刊): 38—51.
- 【4】 洪云汉等, 1985. 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, **12**(1): 67—71.
- 【5】 管瑞光等, 1979. 草鱼、团头鲂染色体组型的分析比较. 遗传学报, **6**(2): 205—209.
- 【6】 小島吉雄, 1982. 魚類の性染色体の進化. 染色体. II-27—28: 849—859.
- 【7】 Blaxhall, P. C., 1983. Chromosome karyotyping of fish using conventional and G-banding methods. *J. Fish Biol.*, **22**: 417—424.
- 【8】 Gold, J. R., 1984. Silver-staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer regions

1) 桂建芳、周瞰, 4 种鲤科鱼和 1 种鲴科鱼的银染核型研究. 手稿。

- in north American cyprinid fishes. *Copeia*, (1): 133—139.
- [9] Ikeuchi, T., 1984. Inhibitory effect of ethidium bromide (EB) on mitotic chromosome condensation and its application to high-resolution chromosome banding. *Cytogenet. Cell Genet.*, **38**: 56—61.
- [10] Matsubara, T., et al., 1983. High-resolution banding by treating cells with acridine orange before fixation. *Cytogenet. Cell Genet.*, **35**: 148—151.
- [11] Park, E. H., et al., 1981. Distribution of C-band heterochromatin in the ZW sex chromosomes of European and American eels (Anguillidae, Teleostomi). *Cytogenet. Cell Genet.*, **31**: 167—174.
- [12] Ronne, M., 1983. Simultaneous R-banding and localization of dA-dT clusters in human chromosomes. *Hereditas*, **98**: 241—248.
- [13] Rybak, J., et al., 1982. A simple reproducible method for prometaphase chromosome analysis. *Hum. Genet.*, **60**: 328—333.
- [14] Schempp, W., et al., 1981. Chromosome banding in Amphibia VI. BrdU-replication patterns in Anura and demonstration of XX/XY sex chromosomes in *Rana esculenta*. *Chromosoma*, **83**: 697—710.

FURTHER IMPROVEMENT OF THE BRDU-HOECHST-GIEMSA METHOD AND STUDIES OF BRDU-REPLICATION BAND KARYOTYPES OF *MYLOPHARYNGODON PICEUS* AND *CTENOPHARYNGODON IDELLUS*

Gui Jianfang and Zhou Tun

(Department of Biology, Wuhan University)

Abstract

An improved BrdU-Hoechst-Giemsa method for revealing BrdU-replication bands in fish chromosomes was further modified and used for karyotypic analyses of *Mylopharyngodon piceus* and *Ctenopharyngodon idellus*. One important step when using this method is the timing of cell cycle of the fish studied. BrdU, AMD, Hoechst 33258 and EB, AO, especially the first three base-specific DNA-binding chemicals, were found to have effects on inhibiting condensation of fish chromosomes. The problem about the mechanism of BrdU-replication banding in fish chromosomes is briefly discussed.

Key words BrdU-replication band, karyotype, cyprinid fishes