

# 鱼类微细胞和小分离细胞 制备技术的研究

徐晓玲 蒋一珪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

## 提要

本文以3种鱼类组织细胞系为材料, 对鱼类微细胞和小分离细胞制备技术及其形成机制进行了研究。在微细胞制备中, 观察了细胞的微核化过程, 微核是由间期状态的细胞核不规则分裂而成。光镜和扫描电镜观察表明, 在小分离细胞聚集体形成过程中, 细胞核的变化与微细胞的微核化过程相一致, 但其细胞质的分裂机制不同, 当细胞质进行异常分裂的同时, 细胞的微核也随同细胞质不规则分裂而被分配至各个小分离细胞内。

**关键词** 微细胞, 小分离细胞, 微核化

微细胞和小分离细胞都是用于研究遗传物质转移的细胞片段, 它们由完整细胞的部分遗传物质和包裹于其外的少量细胞质和细胞膜组成。微细胞制备技术是在70年代建立的<sup>[1]</sup>, 并有小分离细胞的报道<sup>[2]</sup>。这方面的工作在哺乳类体细胞遗传学中得到广泛的运用<sup>[3-10]</sup>。我们将哺乳类微细胞和小分离细胞制备方法应用于鱼类, 为鱼类外源染色体转移和鱼类遗传育种等研究提供新的技术途径。

## 材料与方法

**细胞** 鲫鱼 (*Carassius auratus* Linnaeus) 囊胚细胞 (CAB-80) 由本室提供。银鲫 (*Carassius auratus gibelio* Bloch) 尾鳍组织细胞 (CAG-87) 和兴国红鲤 (*Cyprinus carpio* L. red variety) 尾鳍组织细胞 (CCRV-87) 由作者培养。

**培养液** 上述几种细胞均采用TC-199培养液培养。内含15%小牛血清和100I.U/ml青霉素, 100μg/ml链霉素, 50I.U/ml卡那霉素。培养温度为27℃。将3种细胞按 $1 \times 10^5$ 细胞/ml密度分别接种于10ml链霉素瓶内, 24h后加入秋水仙胺, 使其终浓度在CAB-80细胞中分别为20、10、5、2.5、1.2和0.6μg/ml, CCRV-87细胞分别为1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05和0.025μg/ml, CAG-87细胞分别为20、10、5、2.5、1.25、0.6、0.3、0.15和0.075μg/ml。48、72h后用卡诺液固定20min, Giemsa染色15min, 冲洗干净后, 计数微核化细胞的百分比。

**秋水仙胺处理时间及对细胞脱落的影响** 细胞按上述密度接种, CAB-80 细胞用终浓度为  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ , CCRV-87 细胞为  $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ , CAG-87 细胞为  $0.3\mu\text{g}/\text{ml}$  的秋水仙胺处理, 每隔 24h 任取 3 瓶固定染色, 并计算微核化细胞的百分比。整个实验历时 5d。按上述方法接种细胞和处理细胞, 每隔 24h 任取 2 瓶制成细胞悬液, 计数并与对照组比较, 计算出实验组瓶内相对细胞数目。

**微细胞制备及其活力测定** 将生长良好的 CAG-87 细胞制成  $2 \times 10^5$  细胞/ $\text{ml}$  密度, 接种在装有“弹型塑料片”的培养皿内, 24h 后加入终浓度为  $0.3\mu\text{g}/\text{ml}$  的秋水仙胺, 细胞生长至 48h, 取出生长有细胞的塑料片, 放入 50ml 的离心管中。第一次离心时, 离心管内装有血清浓度为 10% 的 TC-199 培养液, 12200r/min 离心 30min。第二次离心时, 离心管内含有细胞松弛素 B (终浓度为  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的 TC-199 培养液, 18100r/min 离心 20min, 整个过程在 20°C 下进行。收集的细胞悬液用无血清的 TC-199 培养液洗两次, 用直径为 25mm 的针头滤器, 孔径为  $8\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤。纯化的细胞悬液按 2500r/min 离心 5min, 收集悬液置显微镜下作活体观察, 记录照像。部分细胞固定, 染色、观察大小不等的微核, 照像。另一部分细胞悬液在 4°C 存放 24h 后, 用 0.5% 台盼蓝进行排斥染色实验, 测定其存活率。

#### 小分离细胞聚集体形成机制研究

**光镜观察** CAB-80 细胞按  $4 \times 10^4$  细胞/ $\text{cm}^2$  密度接种于 100ml 培养瓶内, 16—20h 后, 加入终浓度为  $0.3\mu\text{g}/\text{ml}$  的秋水仙胺。10—14h 后, 用吸管轻轻吹下贴壁不牢的有丝分裂中期细胞, 以 800r/min 离心 6min, 弃上清液, 用 PBS 生理盐水洗两次, 然后按  $4 \times 10^4$  细胞/ $\text{cm}^2$  密度接种于 pH 8.0, 无血清的 Eagle 培养液中, 4°C 低温处理 10h, 27°C 培养 2h, 在倒置显微镜下观察细胞的不规则分裂过程。

**扫描电镜观察** 将低温处理的细胞, 在 27°C 培养 10min、2h 的细胞和单个小分离细胞分别接种在 Formvar 膜的盖玻片, 用 0.2% 戊二醛固定, 酒精系列脱水, 临界点干燥, 真空喷镀黄金, 置扫描电镜观察、记录照像。

**细胞核观察** 以收集的有丝分裂中期细胞, 经低温处理后恢复正常温度培养 10min 和 2h 的细胞为材料, 分别用培养液和蒸馏水各半的低渗液处理 10min, 甲醇-冰醋酸固定液固定 15min, 600r/min 离心 5min, 收集细胞, 滴片, 空气干燥, Giemsa 染色, 光镜观察, 照像。

#### 影响小分离细胞聚集体形成的因素

**低温处理时间与温度** 将收集的有丝分裂中期细胞, 在 4°C 分别处理 6、8、10、12 和 14h 后, 在 27°C 培养 2h, 计数小分离细胞聚集体占细胞群体的百分比。将收集的有丝分裂中期细胞分别接种在零度、2°C、4°C 和 6°C, 处理时间为 10h, 正常温度培养 2h, 计数小分离细胞聚集体占细胞群体的百分比。

**不同 pH 值与不同培养液的影响** 将收集的有丝分裂中期细胞分别接种在 pH 为 6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5 的 Eagle 培养液中, 4°C 处理 12h 后, 正常温度培养 2h; 将收集的有丝分裂中期细胞分别接种在 TC-199, Eagle 培养液和 HBSS, CBSS 生理盐水等 4 种培养液中, 在 4°C 处理 8h, 正常温度培养 2h, 分别计算小分离细胞聚集体的百分比。

#### 小分离细胞的大小及活力测定

将制得的小分离细胞聚集体用吸管轻轻吹打, 使其

分散为单个小分离细胞,用直径为25mm的针头滤器,孔径为8μm的微孔滤膜过滤。收集物置2200r/min离心5min。取一滴细胞悬液于载玻片上,用测微尺测定小分离细胞的大小,同时测定完整细胞大小作比较。取制得的部分小分离细胞用0.5%的台盼蓝进行排斥染色实验;另一部分小分离细胞与脱膜的兴国红鲤受精卵融合。用50%的PEG(50%PEG+5%DMSO)作为融合剂,小分离细胞与受精卵融合后用Bouin液固定,作连续切片观察。另将正常受精卵处理后作对照。

## 结 果

### 1.3 种鱼类细胞微核化条件

不同浓度的秋水仙胺和不同处理时间诱导3种鱼类细胞的结果表明,当秋水仙胺浓度为10μg/ml,处理时为72h,诱导CAB-80细胞微核化的比例可达60%左右;CCRV-87细胞对秋水仙胺的浓度和处理时间较敏感,当浓度为0.2μg/ml,处理时间为48h,细胞

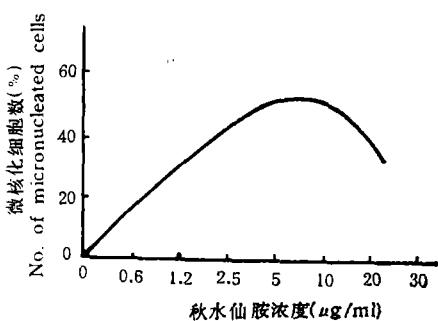


图1 不同浓度的秋水仙胺处理CAB-80细胞48h后,细胞群体中微核化的百分比

Fig. 1 Percentage of micronucleated cells in CAB-80 after treatment for 48h with colcemid of different concentrations

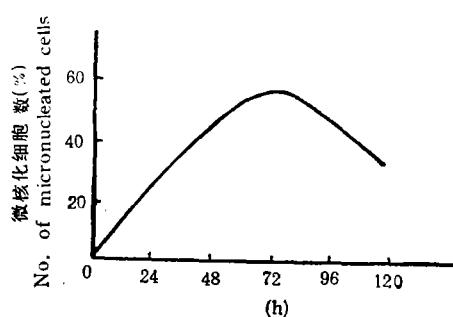


图2 不同处理时间对CAB-80细胞的微核化效应

Fig. 2 Induction of micronucleation of CAB-80 cells in relation to treatment time (colcemid concentration: 10μg/ml)

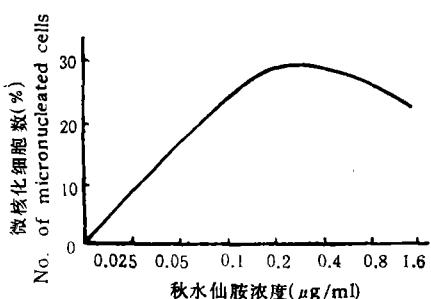


图3 不同浓度的秋水仙胺处理CCRV-87细胞48h后,细胞群体中微核化的百分比

Fig. 3 Percentage of micronucleated cells in CCRV-87 after treatment for 48h with colcemid of different concentrations

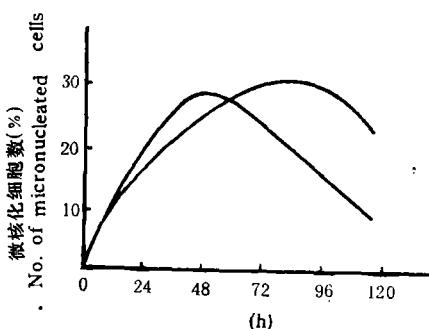


图4 不同处理时间对CCRV-87(0.2 μg/ml)和CAG-87(0.3 μg/ml)细胞的微核化效应

Fig. 4 Induction of micronucleation of CCRV-87 (0.2μg/ml) cells and CAG-87 (0.3μg/ml) cells in relation to treatment time respectively

群中微核化细胞比例可达 30% (图 1—4)。而 CAG-87 细胞被不同浓度的秋水仙胺处理 72h, 微核化细胞的比例没有明显变化, 都在 30% 左右(表 1, 图 4)。虽然秋水仙胺可诱导 3 种鱼类细胞呈现不同的微核化效应(图版 I:1, 2), 但它们的共同点是随着处理时间延长, 细胞数量不断下降(图 5)。因此, 秋水仙胺浓度和处理时间是影响细胞微核化的重要因素。长时间的处理和高浓度的秋水仙胺对细胞都有毒害作用。

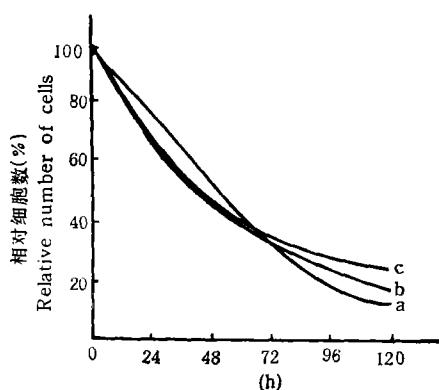


图 5 由于瓶内中期细胞的离壁和死亡,CAB-80 细胞 (a), CCRV-87 细胞 (b) 和 CAG-87 细胞 (c) 贴壁细胞数目逐渐减少

Fig. 5 Decreases in the number of CAB-80 cells (a), CCRV-87 cells (b) and CAG-87 cells (c) in flasks caused by mortality and detachment of metaphase-arrested cells respectively

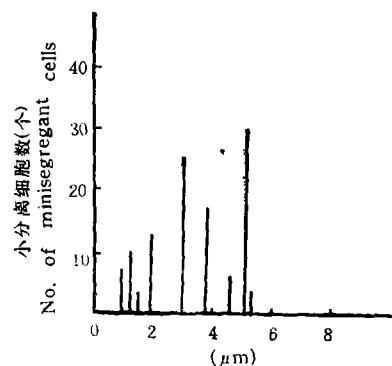


图 6 CAB-80 小分离细胞大小测定

Fig. 6 Measurement of the size of CAB-80 minisegregant cells

表 1 秋水仙胺浓度对 CAG-87 细胞的微核化效应

Tab. 1 Induction of micronucleation of CAG-87 cells after treatment for 72 h with colcemid of different concentration

秋水仙胺浓度①	20	10	5	2.5	1.25	0.6	0.3	0.15	0.075
微核化细胞数目②(%)	25	35	30	29	33	30	31	31	30

① Concentration of colcemid; ② No. of micronucleated cells

## 2. 微核的形成, 微细胞的结构及活力

在光镜下微细胞大小不一, 表面较光滑(图版 I:5), Giemsa 染色表明, 微细胞的核也大小不一, 并且都处于间期状态(图版 I:6)。3 种鱼类细胞的微核化过程表明, 微核是由间期状态的细胞核进行异常分裂形成(图版 I:3), 在形成的微核中, 大的微核还可继续分裂成更小的微核(图版 I:4)。对 4℃ 条件下存放了 24h 的微细胞进行了台盼蓝排斥染色实验, 结果表明 518 个微细胞中有 488 个排斥染色, 微细胞的存活率为 94%。

## 3. 小分离细胞聚集体的形成机制

**光镜观察** 在倒置显微镜下观察了小分离细胞聚集体的形成过程。接种 16—20h 的

CAB-80 细胞，此时细胞稀网状并有少量变圆的有丝分裂，加入秋水仙胺 10—14h 后，收集有丝分裂细胞置低温处理 10h，然后恢复 27°C 培养。随着培养时间的延长，细胞开始进行不规则分裂，当细胞质流动时，整个细胞开始滚动，细胞表面形成许多大小不一的突起，直至形成小分离细胞聚集体，即由一个细胞分裂成许多大小不等的小分离细胞（图版 II:10）。

**扫描电镜观察** 为了更清楚地了解小分离细胞的形成过程，分别对低温处理的有丝分裂中期细胞、经低温处理后恢复温度培养的细胞和培养 2h 的细胞以及单个小分离细胞进行了扫描电镜观察。结果表明冷处理的有丝分裂细胞呈圆型，细胞表面有许多纤细的突起和指状（图版 II:11）。低温处理后恢复培养温度 10min 的细胞表面已形成较大突起，但细胞质还没有完全分裂（图版 II:12）。正常培养 2h 后，有些细胞完全分裂成许多小分离细胞组成的聚集体（图版 II:13）。单个小分离细胞比完整细胞小很多，其表面有的部分光滑，部分不光滑。

**小分离细胞聚集体形成中遗传物质的分配** 单个小分离细胞是否含遗传物质？如果有又是怎样分配的？研究结果表明，经低温处理的有丝分裂细胞中有的核呈染色体结构，有的核已进入间期并开始异常分裂，有的形成了微核，但细胞质还没有进行不规则分裂（图版 II:7）；恢复温度培养 10min 的细胞中，有的核形成了微核，有些细胞核随着胞质的不规则分裂而分裂（图版 II:8）；培养 2h 后的细胞中，大多数细胞已完全分裂成许多大小不等的微核，分散于单个小分离细胞中（图版 II:9）。由此可见，一个完整细胞分裂成小分离细胞聚集体，是秋水仙胺和低温共同作用的结果。前者搅乱纺锤体的形成，使一个不同步的细胞群体中的部分细胞停留于分裂的中期，后者使细胞骨架系统遭到破坏，失去正常分裂的功能。因此，当恢复正常培养后，细胞就发生异常分裂，细胞核形成微核并随胞质的不规则分裂而被分配到各个小分离细胞内。

#### 4. 影响小分离细胞聚集体形成的因素

**低温处理时间** 不同的低温处理时间对 CAB-80 小分离细胞聚集体形成的影响（表 2），从中可以看出，低温处理 10h，小分离细胞聚集体形成的比例占总数的 45%，处理 6h 或 14h，其比例大大降低，分别为 22% 和 12%。因此，低温处理时间太长或太短都不利于小分离细胞聚集体的形成，10h 较适宜。

表 2 低温处理时间与小分离细胞聚集体形成的关系

Tab. 2 Relationship between formation of minisegregant cells and cold storage time

低温处理时间① (h)	培养液②	CAB-80 细胞		
		小分离细胞聚集体数目③	细胞总数④	百分比(%)⑤
6		66		22
8		87		29
10	Eagle, pH8.0	135	300	45
12		73		24
14		35		12

① Time of cold storage; ② Medium; ③ No. of minisegregant cells; ④ No. of cells ⑤ Percentage of minisegregant cells

**低温处理温度** 不同的冷处理温度对小分离细胞聚集体形成的影响(表3)。4℃处理,小分离细胞聚集体形成的比例达40%,升高或降低处理温度,其比例都下降。因此,4℃是CAB-80细胞适宜的冷处理温度。

表3 冷处理温度与小分离细胞聚集体形成的关系

Tab. 3 Relationship between formation of minisegregant cells and temperature of cold storage

冷处理温度①	培养液②	CAB-80 细胞		
		小分离细胞聚集体数目③	细胞总数④	百分比(%)⑤
0℃		47		23
2℃	Eagle, pH8.0	60	200	30
4℃		81		40
6℃		77		34

表内① Temperature of cold storage; ②—⑤注同表2。

**不同pH值** 不同pH影响CAB-80小分离细胞聚集体的形成(表4)。在一定范围内较高的pH值有利于形成,如pH值为8.0,8.5时,其形成比例分别占细胞总数的60%和62%,随着pH值下降,形成比例也逐渐下降。

表4 pH值与小分离细胞聚集体形成的影响

Tab. 4 Effects of pH on formation of minisegregant cells

pH 值 pH value	培养液②	CAB-80 细胞		
		小分离细胞聚集体数目③	细胞总数④	百分比(%)⑤
6.5		144		48
7.0		156		52
7.5	Eagle	160	300	56
8.0		180		60
8.5		185		62

表内②—⑤注同表2。

表5 四种培养液对小分离细胞聚集体形成的影响

Tab. 5 Effects of four media on formation of minisegregant cells

培养液②	pH值 pH value	CAB-80 细胞		
		小分离细胞聚集体数目③	细胞总数④	百分比(%)⑤
Eagle		124		41
TC-199	8.0	83	300	28
HBSS		144		48
CBSS		96		32

表内②—⑤注同表4。

**四种不同培养液的效果** 比较了Eagle、TC-199培养液和HBSS, CBSS生理盐水对CAB-80小分离细胞聚集体形成的影响(表5)。结果表明,HBSS生理盐水的效果最好,其比例达48%,Eagle培养液也可达41%。其他两种培养液效果较差。

### 5. 小分离细胞的大小及活力测定

**小分离细胞的大小测定** 在测定的 109 个 CAB-80 完整细胞中, 细胞直径的变化范围是 15—20 μm, 其中直径为 15 μm 的有 29 个(占 26.6%), 直径为 18 μm 的有 32 个(占 29.3%), 直径为 20 μm 的有 46 个(占 42.2%), 其平均直径为 17 μm; 在测定的 135 个小分离细胞中, 细胞的变化较大, 没有规律, 直径最大的为 5.2 μm, 最小的为 1 μm, 平均直径为 3.26 μm。

**小分离细胞的活力测定** 用 0.5% 的台盼蓝进行排斥染色实验表明, 制得的小分离细胞对台盼蓝溶液具有排斥染色的能力, 证明它们是有活力的。在与脱膜受精卵融合后的连续切片中, 观察到了融合的小分离细胞, 这进一步证明小分离细胞具有活力。但在第一次卵裂前的一些受精卵连续切片中观察到融进的小分离细胞核仍保持其原来的间期状态, 没有发展成染色体状态(图版 II: 14)。

## 讨 论

### 1. 鱼类微细胞与小分离细胞形成机制及其差别

微细胞是一种转移遗传物质的有效媒介<sup>[1,6,7]</sup>, 这已由很多遗传实验所证明。但关于微细胞形成的机制问题, 仍有一些不同的见解。Ringertz 等人<sup>[4]</sup>根据一些动物细胞的资料, 提出了一个假设: 当细胞被秋水仙胺作用阻抑于分裂中期时, 微管失去正常功能, 染色体发生浓缩, 广泛地分散于细胞质中, 由核膜把单个染色体或若干个染色体包封起来, 随后这些染色体又发展成间期状态, 形成微核, 在细胞松弛素 B 和高速离心双重作用下, 即可获得微细胞。在细胞微核化过程中, 核膜是将整个染色体群包封起来, 形成一个间期核, 再由这个间期核进行芽状分裂后形成微核<sup>[3]</sup>。我们在鱼类微细胞制备研究中, 对 3 种鱼类细胞的微核化过程进行观察, 结果表明, 鱼类细胞的微核是由一个重新形成的间期核进行不规则分裂的结果(图版 I: 3), 在已形成的微核中, 大的微核还可以再次分裂形成更小的微核。因此, 在鱼类细胞中观察到的微核化过程与哺乳类小鼠二倍体细胞的微核化过程是一致的。

关于小分离细胞的形成机制, 一般认为低温处理使微管微丝分解<sup>[11,12]</sup>, 因此, 当恢复正常培养温度后, 细胞发生不规则分裂, 从而形成小分离细胞聚集体。关于小分离细胞聚集体形成过程中细胞形态的变化已有较多的观察<sup>[2,8]</sup>, 但对此过程中细胞核的变化和核物质的分配过程则还无详细报道。从实验来看, 小分离细胞聚集体形成过程中细胞核的变化情况与微细胞形成过程中细胞的微核化过程是相同的, 即同样由间期状态的核通过不规则分裂而形成小分离细胞的微核, 如在秋水仙胺和低温处理后收集的细胞中, 可以看到细胞的微核化发展过程, 有的细胞正处于分裂的中期, 有的核已进入间期并正进行不规则分裂, 而有的细胞核已经分裂成了若干微核。但从微核向小分离细胞分配过程来看, 则和微核化细胞形成微细胞的过程是不相同的。在微细胞形成中, 微核是在高速离心和细胞松弛素 B 的双重作用下, 连同少量的细胞质和部份细胞膜一起分离贴壁细胞, 最终残余的细胞质块仍然贴附在瓶壁上。而在小分离细胞聚集体形成过程中, 微核是随同细胞质的

不规则分裂而被分配至各个小分离细胞中去，整个细胞最终分裂成为一个小分离细胞聚集体，没有留下残余的细胞质块。因此，微细胞与小分离细胞的微核形成机制是相同的，而它们的细胞质分裂机制则是不同的。

## 2. 鱼类微细胞和小分离细胞制备比较及活力

本研究结果表明，由鱼类细胞产生微核化细胞的比例较低，在30%左右。Ojima等<sup>[13]</sup>用高体鳑鲏(*Rhodeus ocellatus* Kner)鱼的原代细胞为材料，使细胞同步后，再用秋水仙胺处理，其微核化细胞的比例也只有33.3%。这说明要在鱼类细胞中获得高比例的微核化细胞是比较困难的。因此，离心后得到的细胞混合群体中微细胞的产量相应较低，这给微细胞的纯化工作带来了一定的困难。同时长时间和高浓度的秋水仙胺处理对鱼类培养细胞有较大的毒害作用，引起中期细胞的离壁和死亡，使细胞的活力受到影响。相对而言，鱼类小分离细胞的制备方法比较简单，操作简化。更为有利的是可以缩短秋水仙胺的处理时间，降低其浓度，减小药物对细胞的毒害作用。如对CAB-80细胞采用的秋水仙胺浓度为0.1—0.3μg/ml，处理时间为12—14h，既降低了药物浓度，又缩短了处理时间，有利于保证小分离细胞活力，提高杂种细胞的克隆率。因此以小分离细胞为媒介研究遗传物质的转移是一种比较好的方法。

从台盼蓝排斥染色实验和融合受精卵切片观察证实，小分离细胞是有活力的，能够与脱膜的受精卵融合。如能进一步探索融合的最佳时机，以小分离细胞为介导，在染色体水平上向鱼卵转移遗传物质是有一定实际意义的。

## 参 考 文 献

- [1] 颜永杉，1983。通过微型细胞转入外源染色体研究。遗传学报，10(3): 209—215。
- [2] 颜永杉，1983。从中国仓鼠细胞株诱导产生小分离细胞。遗传学报，10(1): 51—55。
- [3] 颜永杉、雪霞辉，1984。小鼠二倍体细胞微细胞形成机制研究。遗传，6(2): 34。
- [4] 陈瑞铭等译(N. R. 林格兹, R. E. 萨维奇著), 1982。杂种细胞, p. 143—144。科学出版社。
- [5] Ege, T. and Ringertz, N. R., 1974. Preparation of microcells by enucleation of micronucleate cells, *Exp. Cell Res.* 87: 378—382.
- [6] Fournier, R. E. K. and Ruddle, F. H., 1977 Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse, Chinese hamster and human somatic cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 319—323.
- [7] Fournier, R. E. K., 1981. A general high efficiency procedure for production of microcell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6347—6353.
- [8] Johnson, R. T., Mullinger, A. M., and Skear, R. J., 1975. Preparation of mammalian cell division: Human minisegregants derived from mitotic cells, *Proc. R. Soc. Lond. B* 189: 591—602.
- [9] McNeill, C. A., and Brown, R. L., 1980. Genetic manipulation by means of microcell-mediated transfer of normal human chromosome into recipient mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5394—5398.
- [10] Melton, D. M., 1981. Cell fusion-induced mouse neuroblastoma HPRT revertants with variant enzyme and elevate HRRT protein levels. *Somatic Cell Genetics*, 7: 331—344.
- [11] Pollard, T. D., 1976. The role of actin in the temperature-dependent gelation and contraction of extracts of acanthamoeba. *J. Cell Biology*, 68: 579—601.
- [12] Stosset, T. P. and Harturig, J. H., 1976. Interaction of actin, myosin, and a new actin-binding protein of rabbit pulmonary macrophages. *J. Cell Biology*, 68: 602—619.
- [13] Yoshio Ojima, Yutake Takarada, and Akinori Takai, 1986. Microcell-mediated transfer of fish chromosome into mouse cell. *Proc. Japan Acad.* 62: 91—94.

## STUDIES ON THE TECHNIQUES FOR THE PREPARATION OF FISH MICROCELLS AND MINISEGREGANT CELLS

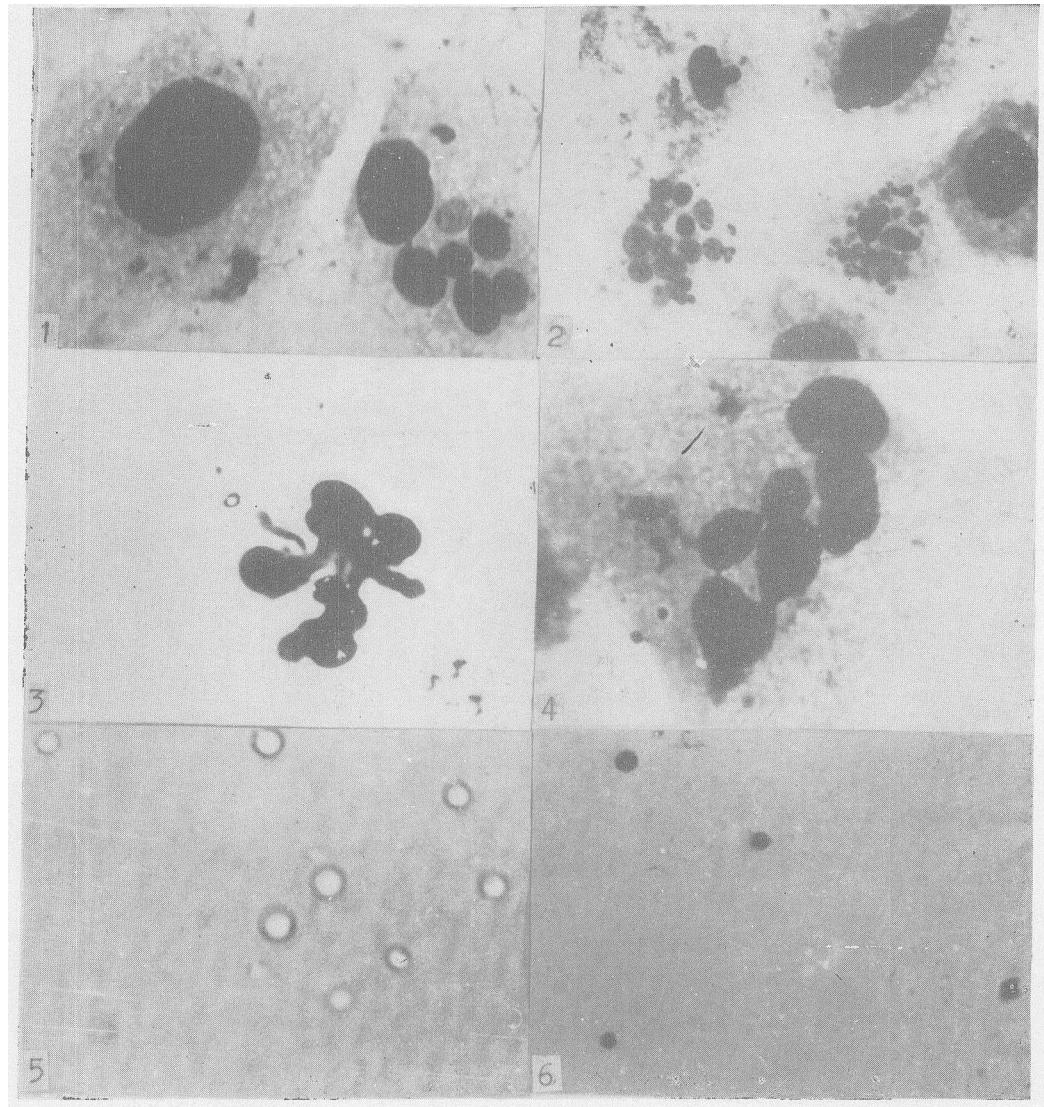
Xu Xiaoling and Jiang Yigui

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

### Abstract

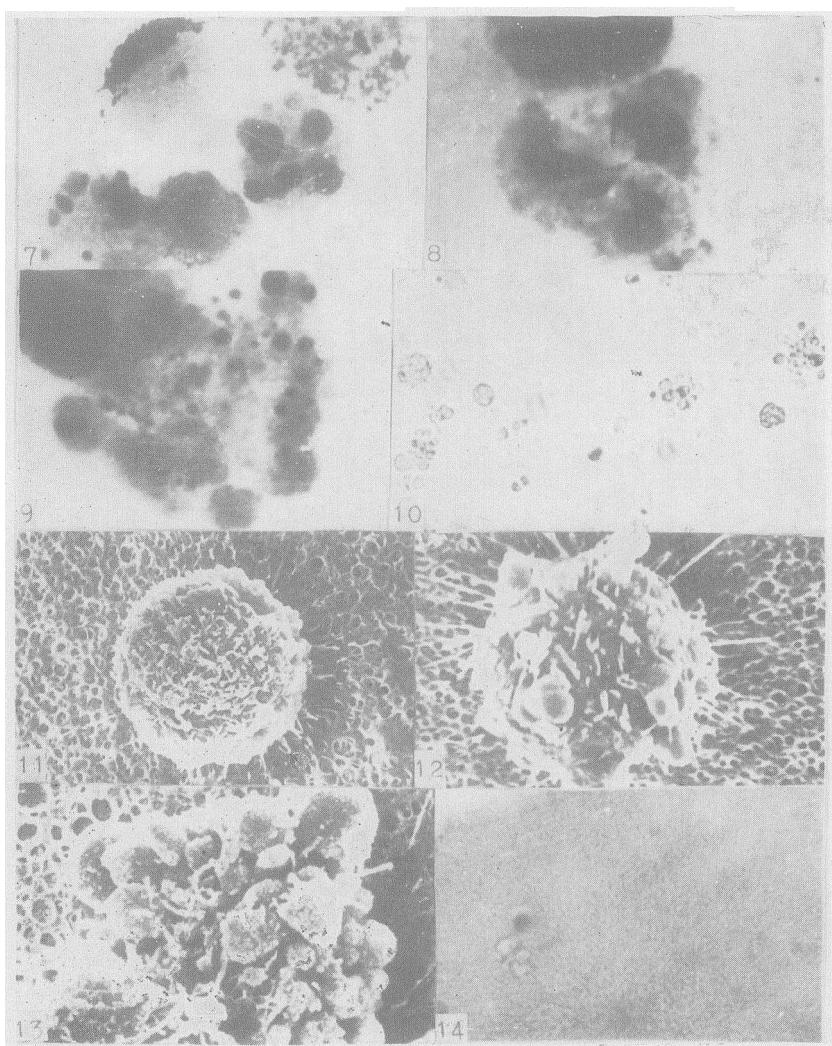
Using CAB-80 CAG-87 and CCRV-87 (these cell lines were derived from crucian carp blastula, caudal fin of crucian carp and caudal fin of Xingguo red carp respectively), we studied the preparation of fish microcells and minisegregant cells and the mechanism of their formation. In the preparation of microcells, observations were made on the process of micronucleation. The formation of micronuclei was the result of irregular division of interphase nuclei. We also studied the effects of colcemid concentration and treatment time on the proportions of micronucleated cells in the three cell lines. The proportion of micronucleation achieved was 60% for CAB-80, and 30% for CCRV-87 and CAG-87. High concentrations of colcemid or prolonged treatment time is toxic to the cells. The main procedures which can yield large quantities of fish minisegregant cells are as follows, 16-20 hours after incubation, colcemid is added to the cultures of CAB-80 cells at a final concentration of 0.3 $\mu$ g/ml. Mitotic cells are obtained by continuing incubation for another 10—14 hours. Then the mitotic-blocked cells are collected and stored at 4°C for 10 hours. At a temperature of 27°C and a pH of 8.0, many cells display highly irregular patterns of division and about 50% of them form minisegregant cells. Analysis of genetic material distribution and scanning electron microscopy showed that, in the formation of minisegregant cells, the process of nucleus change is the same as that of micronucleation, however, the mechanism of cytokinesis is different. Micronuclei are separated into many daughter cells due to the irregular cleavage of the cytoplasm.

**Key words** Microcells, Minisegregant cells, Micronucleation



1.微核化的 CAG-87 细胞,  $\times 1000$ ; 2.微核化的 CAB-80 细胞,  $\times 500$ ; 3.不规则分裂的细胞核,  $\times 1000$ ; 4.大的微核继续分裂,  $\times 1500$ ; 5.用 CAG-87 细胞制备的微细胞,  $\times 600$ ; 6. Giemsa 染色的微核,  $\times 600$

1. Micronucleated cell of CAG-87,  $\times 1000$ ; 2. Micronucleated cell of CAB-80,  $\times 500$ ; 3. Abnormal division of interphase nucleus,  $\times 1000$ ; 4. Continuing division of big micronucleus,  $\times 1500$ ; 5. Microcells of CAG-87,  $\times 600$ ; 6. Micronucleus stained by Giemsa,  $\times 600$



7. 4℃ 低温处理后, 细胞核的变化,  $\times 600$ ; 8. 异常分裂的细胞核和细胞质,  $\times 1000$ ; 9. 微核在小分离细胞内的分配情况,  $\times 1000$ ; 10. 小分离细胞聚集体,  $\times 300$ ; 11. 扫描电镜示4℃处理后的中期细胞,  $\times 7000$ ; 12. 扫描电镜示异常分裂细胞,  $\times 7000$ ; 13. 扫描电镜示小分离细胞聚集体,  $\times 8000$ ; 14. 示融进受精卵的微核,  $\times 600$

7. The change of nuclei after stored at 4°C for 10 hours,  $\times 600$ ; 8. Irregular division of nucleus and cytoplasts,  $\times 1000$ ; 9. Micronuclei separated into many daughter cells,  $\times 1000$ ; 10. Minisegregant cell of CAB-80,  $\times 300$ ; 11. Mitotic cell after stored 4°C for 10 hours,  $\times 7000$ ; 12. Irregular division of CAB-80 cells,  $\times 7000$ ; 13. Minisegregant cells of CAB-80 cells,  $\times 8000$ ; 14. Fused micronuclei in fish fertilized egg,  $\times 600$