

中华人民共和国国家标准

GB/T 18654.12—2008
代替 GB/T 18654.12—2002

养殖鱼类种质检验 第 12 部分: 染色体组型分析

Inspection of germplasm for cultured fishes—
Part 12: Method for the karyotype analysis

2008-07-31 发布

2008-11-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前　　言

GB/T 18654《养殖鱼类种质检验》分为下列部分：

- 第 1 部分：检验规则；
- 第 2 部分：抽样方法；
- 第 3 部分：性状测定；
- 第 4 部分：年龄与生长的测定；
- 第 5 部分：食性分析；
- 第 6 部分：繁殖性能的测定；
- 第 7 部分：生态特性分析；
- 第 8 部分：耗氧率与临界窒息点的测定；
- 第 9 部分：含肉率测定；
- 第 10 部分：肌肉营养成分的测定；
- 第 11 部分：肌肉中主要氨基酸含量的测定；
- 第 12 部分：染色体组型分析；
- 第 13 部分：同工酶电泳分析；
- 第 14 部分：DNA 含量的测定；
- 第 15 部分：RAPD 分析；
-

本部分为 GB/T 18654 的第 12 部分。

本部分代替 GB/T 18654.12—2002《养殖鱼类种质检验 第 12 部分：染色体组型分析》。

本部分与 GB/T 18654.12—2002 相比主要变化如下：

- 增加了数码照相等先进技术；
- 对 7.2.9 中的低渗时间进行了调整修订；对 5.4 中碳酸氢钠(NaHCO_3)的浓度做了补充说明；对 3.6、7.2.4、7.2.12、7.3.2 和 8.3 中描述的部分操作方法予以修改补充；对第 6 章中仪器设备予以补充完善；
- 对第 3 章至第 8 章中的部分实验描述修改准确，对部分文字描述予以更正；
- 对附录 A.3.4 和 A.3.5 中部分文字描述予以修订，增加 B.2.1 数码显微照相内容。

本部分的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本部分由中华人民共和国农业部提出。

本部分由全国水产标准化技术委员会淡水养殖分技术委员会归口。

本部分起草单位：中国水产科学研究院长江水产研究所。

本部分主要起草人：方耀林、周瑞琼、邹世平。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 18654.12—2002。

养殖鱼类种质检验

第 12 部分: 染色体组型分析

1 范围

GB/T 18654 的本部分规定了鱼类染色体组型分析的原理、试剂和材料、仪器和设备、玻片标本的制备和组型分析。

本部分适用于养殖鱼类染色体组型分析,对于自然种群鱼类及其他水生动物亦可参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 18654 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 18654.2 养殖鱼类种质检验 第 2 部分: 抽样方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于 GB/T 18654 的本部分。

3.1

体细胞体外培养法 somatic cell culture in vitro

通过无菌操作,获取鱼的肾脏组织细胞或血细胞,在体外培养过程中,加入细胞分裂刺激物,刺激淋巴细胞大量进入分裂状态。然后,加入适当浓度的秋水仙素,使细胞分裂被阻抑在分裂中期,而获得鱼类细胞染色体中期分裂相。

3.2

体细胞体内培养法 somatic cell culture in vivo

通过向鱼体内注射细胞分裂刺激物,刺激淋巴细胞大量进入分裂状态。取出头肾组织在生理盐水中将其充分撕碎,再加入适当浓度的秋水仙素。

3.3

体细胞直接法 direct method of somatic cells

将小鱼浸泡在适当浓度的秋水仙素溶液中,使其分裂旺盛的鳃丝上皮细胞被阻抑在分裂中期,而获得鱼类细胞染色体中期分裂相。

3.4

胚胎细胞直接法 direct method of embryo cells

选用发育正常的囊胚期或原肠期早期胚胎,将其细胞吹打分散后,加入适当浓度的秋水仙素,将细胞阻抑在分裂中期,获得鱼类细胞染色体中期分裂相。

3.5

空气干燥法 air-drying technique

将收集的细胞经过低渗、固定、滴片,然后斜放静置,待其自然干燥。

3.6

火焰干燥法 flame-drying technique

将收集的细胞经过低渗、固定、滴片,然后立即将玻片置于酒精灯的火焰上均匀烘烤(以玻片上刚出

现蓝色火焰为宜),或直接将玻片置于火焰上滴片。

3.7

臂比 arm ratio

染色体的长臂长度与短臂长度之比。

3.8

相对长度 relative length

每条染色体长度与单倍体组染色体总长度之比,以百分值或千分值表示。

4 原理

使用细胞分裂刺激物刺激鱼类淋巴细胞分裂,或者直接收集细胞分裂旺盛的鳃丝上皮细胞、胚胎细胞。然后利用秋水仙素破坏纺锤丝,使细胞分裂阻抑在分裂中期,再经低渗、固定、滴片和染色,最后进行镜检分析。

5 试剂和材料

5.1 肝素溶液:在无菌状态下,用灭菌蒸馏水配制浓度为 500 IU/mL 的肝素溶液。

5.2 小牛或胎牛血清。

5.3 青霉素、链霉素和卡那霉素。

5.4 培养基:TC-199、RPMI-1640 或 EaglesMEM,培养基应高压灭菌。

培养液配制方法:上述培养基和小牛或胚牛血清的体积比为 4 : 1,每毫升培养液含青霉素、链霉素、卡那霉素分别为 100 IU、100 mg 和 50 IU,用无菌水配制 0.1 mol/L 碳酸氢钠(NaHCO_3)溶液,调至 pH7.2。

5.5 植物血球凝集素(PHA)溶液,根据厂家推荐剂量,用无菌生理盐水配制。

5.6 生理盐水:0.75%~0.85%的氯化钠(NaCl)溶液,应高压灭菌。

5.7 秋水仙素溶液:浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

5.8 甲醇。

5.9 冰乙酸。

5.10 固定液:甲醇和冰乙酸混合液(体积比为 3 : 1),现用现配。

5.11 低渗溶液:0.037 5 mol/L 氯化钾(KCl)溶液。

5.12 吉姆萨(Giemsa)原液:0.5 g Giemsa 粉、甘油 33 mL,在研钵内用少量甘油与 Giemsa 粉混合,研磨至无颗粒时,再将剩余甘油倒入,在 56 °C 条件下保温 2 h 后,加入 33 mL 甲醇,保存于棕色瓶内。

5.13 磷酸缓冲液(PBS):浓度为 0.2 mol/L,配制方法见表 1。

表 1 不同 pH 值的 PBS 配方

单位为毫升

pH 值	A 液[0.2 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)]	B 液[0.2 mol/L 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)]
6.8	49.0	51.0
7.0	61.0	39.0
7.2	72.0	28.0
7.4	81.0	19.0

6 仪器和设备

6.1 无菌室或超净工作台。

6.2 恒温培养箱或二氧化碳培养箱。

6.3 离心机。

- 6.4 天平(感量 0.000 1 g)。
- 6.5 显微镜(带显微摄影)。
- 6.6 照相机、15°黑白胶卷、4 号相纸和整套暗室设备;或数码相机和生物图像分析系统。
- 6.7 游标卡尺(精度 0.01 mm)。
- 6.8 控温电热板。
- 6.9 解剖工具一套。
- 6.10 注射器及针头。
- 6.11 移液器 10 μL~200 μL。
- 6.12 细口吸管、吸管、5 mL~10 mL 离心管、冰冻及干热载玻片。
- 6.13 25 mL 培养瓶或青、链霉素小瓶,瓶塞等。
- 6.14 酒精灯。
- 6.15 碘酒或酒精棉球。
- 6.16 血球计数板。

7 玻片标本的制备

7.1 抽样

样品鱼的抽样按 GB/T 18654.2 的规定执行。

7.2 体细胞体外培养法

体细胞体外培养法常采用肾组织细胞培养和血细胞培养。本部分仅规定了肾组织细胞培养的操作步骤,血细胞培养的操作步骤参见附录 A。

- 7.2.1 将试样鱼鳃血管剪断,尽量放血。刮去鱼体一侧的鳞片,尤其是解剖部位需刮干净。
- 7.2.2 把鱼放在超净工作台上或无菌室内,铺上消毒纱布,用碘酒和酒精棉球依次消毒已去鳞的部位。
- 7.2.3 吸取 3 mL~5 mL 培养液置于青霉素瓶中。
- 7.2.4 打开试样鱼腹腔,取肾组织。
- 7.2.5 用镊子夹取适量肾组织(最好是头肾),放入盛有培养液的青霉素瓶中,将组织块用镊子撕碎,轻轻搅动,然后静置 3 min~5 min,待未撕碎的组织块沉淀。用刻度吸管吸取上部细胞悬液,移入培养瓶内,再加入适量的培养液,使每瓶为 4 mL 或 5 mL。细胞的密度可根据目测浊度进行粗略调整。
- 7.2.6 用注射器滴加 PHA,一般每 5 mL 培养液加 0.1 mL~0.2 mL。盖上胶塞,轻轻摇匀。
- 7.2.7 将已接种的培养瓶平放在恒温培养箱或二氧化碳培养箱(此时需拧松瓶塞)内。培养温度一般为 18 ℃~28 ℃,时间 1 d~5 d。其间,细胞一般分裂 1 次~4 次。可根据具体情况选用合适的培养温度和时间。每天需将培养瓶轻轻摇动 1 次~2 次。
- 7.2.8 收集细胞:在收集细胞前 1.5 h~4 h(少数鱼类可提前),用移液器加入秋水仙素溶液,使其终浓度为 0.1 μg /mL~0.5 μg /mL。收集细胞时,先摇动培养瓶,待细胞悬浮,然后将其倒入离心管,再用少量生理盐水将培养瓶内残留细胞洗出,再倒进离心管。
- 7.2.9 低渗:将收集有细胞的离心管以 700 r/min~1 000 r/min 离心 5 min。然后轻轻吸除上清液,约留 0.5 mL 细胞沉淀。加入 4 mL 低渗溶液,用吸管吹打均匀,室温或 37 ℃ 条件下静置 20 min~50 min。再加入 0.5 mL~1 mL 现配固定液,吹打均匀,以 700 r/min~1 000 r/min 离心 5 min。
- 7.2.10 固定:先吸除上清液,加入少许固定液,吹打均匀,再加入 2 mL~3 mL 固定液,静置 20 min,按 7.2.9 规定离心。再重复固定,必要时可重复固定三次。
- 7.2.11 滴片:吸除上清液,加适量现配固定液,将细胞吹打均匀。吸取细胞悬液在约 45°倾斜的冰冻玻片上滴 2 滴~3 滴,并轻轻吹动,使细胞铺散开。然后将铺散细胞的玻片斜放静置,待其自然干燥,此为空气干燥法。有时为使染色体分散更好,可采用火焰干燥法。
- 7.2.12 染色:用磷酸盐缓冲液(pH7.2)将 Giemsa 原液按 9 : 1 稀释,配成工作液(现用现配)。取一块

干净的玻璃,以略小于玻片长度为间距放置干净玻片作架,将待染的玻片置于染色的容器内,将染液加入,染色 10 min~20 min 后取出,用自来水冲洗玻片背面以去除染液,干燥后即可用于观察分析。

7.3 体细胞体内培养法

- 7.3.1 往样品鱼腹腔注射 PHA 溶液,剂量按厂家推荐剂量使用。然后继续饲养 6 h~120 h。
- 7.3.2 处死鱼前 2 h~6 h,按 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 鱼体重腹腔注射秋水仙素溶液。剪断鳃血管,尽量放血,取出肾脏组织,放入盛有 3 mL~5 mL 生理盐水的青霉素瓶中。将组织块撕碎,用吸管轻轻吹打,静置 3 min~5 min,待未碎的组织块沉淀,用吸管吸取细胞悬液,加入离心管中。

或者不注射秋水仙素,而是先将肾组织取出,撕碎,放入盛有培养液的青霉素瓶中,加入秋水仙素溶液(使培养液中秋水仙素终浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),于 25°C 静置 2 h~3 h。然后用镊子轻轻振荡,待稍沉淀后,用吸管吸出上层细胞悬液,加入离心管中。

- 7.3.3 低渗、固定、滴片、染色分别按 7.2.9~7.2.12 的规定执行。

7.4 体细胞直接法

此法适用于难以取肾的小鱼。

- 7.4.1 将试样鱼放入含有浓度为 0.01% 秋水仙素溶液的容器中浸泡 6 h 左右。
- 7.4.2 放血杀鱼,小心把鳃片剪下,将鳃丝放入低渗液中低渗 20 min~30 min。
- 7.4.3 低渗的鳃丝放入甲醇:冰乙酸为 9:1 的固定液中浸泡处理 7 min~10 min,再转入 100% 的冰乙酸中浸泡处理 1 min~2 min。
- 7.4.4 卡诺氏固定液固定 2 次~3 次,每次 1 h。最后一次可放在常温或冰箱中固定 1 h~15 h。
- 7.4.5 滴片前,将固定过的鳃丝放入 50% 的冰乙酸中,用镊子夹住鳃丝轻轻振动,使细胞从鳃丝上脱落,丢弃鳃弓鳃丝,液体则为细胞悬液。
- 7.4.6 将细胞悬液滴到控温电热板上 50 °C~60 °C 的干净玻片上,5 min 后吸弃多余液体。
- 7.4.7 染色按 7.2.12 的规定执行。

7.5 胚胎细胞直接法

- 7.5.1 用大口径吸管挑选发育正常的囊胚期或原肠期早期胚胎。
- 7.5.2 浮性卵,则用口径稍大于胚胎的小口吸管吸破卵膜,再将胚胎细胞吸入离心管中。粘性卵,则用铲形镊子将卵膜挤破,用吸管将胚胎细胞吸入离心管中。
- 7.5.3 用吸管把胚胎细胞吹打散开,补加生理盐水至 4 mL~5 mL,再加入秋水仙素溶液,秋水仙素终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。静置 15 min~60 min。
- 7.5.4 低渗按 7.2.9 规定执行。
- 7.5.5 固定、滴片、染色分别按 7.2.10~7.2.12 规定执行。

8 组型分析

8.1 染色体数的确定

在油镜下选取 50 个~100 个分散良好,形态清晰,数目完整的分裂相,计数每个分裂相的染色体数目,找出染色体数目的众数,并计算众数所占百分比,据此确定鱼的染色体数。

8.2 染色体分组和臂数的计算

- 8.2.1 鱼类染色体分组一般按臂比将染色体分为四组:

- a) 中部着丝粒染色体 m 组,臂比为 1.00~1.70;
- b) 亚中部着丝粒染色体 sm 组,臂比为 1.71~3.00;
- c) 亚端部着丝粒染色体 st 组,臂比为 3.01~7.00;
- d) 端部着丝粒染色体 t 组,臂比为 7.01~∞。

- 8.2.2 染色体臂数(NF)的计数:中部和亚中部着丝粒染色体的臂数计为 2,亚端部和端部着丝粒染色体的臂数计为 1。

8.3 染色体分组方法

在油镜下选取 10 个~15 个数目完整,分散良好,长度适当(正中期),着丝粒清楚,两条染色单体适度分开,形态清晰的分裂相进行显微摄影。显微摄影的有关事项参见附录 B。在照片上用游标卡尺测量每条染色体的长臂和短臂长度,按 8.2.1 的规定将染色体分组,并按 8.2.2 的规定确定染色体臂数,得出核型公式,然后计算出核型指数,包括臂比和相对长度。选取其中形态最好,最有代表性的一个分裂相,分别剪下各条染色体,按臂比和相对长度,大小配对,并按 m、sm、st 和 t 组顺序排列,每组内染色体按相对长度从大到小排列、贴好,然后拍照,得到染色体组型图谱,该图谱须标明长度比例标尺。

8.4 核型公式

根据对一百个以上的中期分裂相染色体测量分组等分析的结果,就可确定该种鱼类的染色体数目,染色体分组情况,染色体臂数和染色体的相对长度。这一结果的表达式称为核型公式。

示例:某鱼的核型公式为 $2n = 48, 26\text{ m} + 14\text{ sm} + 8\text{ st}, NF = 88$ 。

8.5 其他形态特征的观察

除计数和分组外,还需观察染色体的其他形态特征,如有无异形染色体对、次缢痕、随体等,并计入结果。

附录 A
(资料性附录)
血细胞培养法

A. 1 环境条件

试验操作在无菌室或超净工作台上进行。

A. 2 取样

无菌采血,尾静(动)脉采血或心脏采血均可。

A. 3 淋巴细胞培养

A. 3. 1 用注射器沿离心管壁滴加肝素溶液,湿润管壁,每支离心管加 0.1 mL~0.3 mL。

A. 3. 2 将取有无菌血液的注射器针头取下,弃去最初的 2 滴~3 滴血,把其余的血液滴入上述离心管(勿将血泡沫滴入),盖上胶塞。4 ℃冰箱中静置 2 h 左右,待血液分层,或者将上述装好血液的离心管以 300 r/min 离心 3 min~5 min,使其沉淀分离,留上清液。

A. 3. 3 用刻度吸管移取 3 mL~5 mL 培养液于培养瓶中,加入淋巴细胞,再添加适量培养液调整细胞密度为 5×10^5 个/mL~ 10×10^5 个/mL。

A. 3. 4 用注射器滴加 PHA,每 5 mL 培养液加入 PHA 溶液 0.1 mL~0.2 mL,轻轻吹打,使培养液和细胞混匀,再用刻度吸管分装,每瓶 5 mL,盖上瓶盖。

A. 3. 5 将已接种的培养瓶平放在恒温培养箱或二氧化碳培养箱(此时应尽量保持无菌状态并拧松瓶盖)内,培养温度依鱼的种类不同而有所不同,一般为 18 ℃~28 ℃,时间 1 d~5 d,每天需将培养瓶轻轻摇动 1 次~2 次。

A. 4 微量全血培养

A. 4. 1 用刻度吸管把适量培养液移入培养瓶内,再用注射器滴加 PHA 至(0.1~0.2)mL/5 mL 培养液,混匀后分装,25 mL 培养瓶每瓶 4.7 mL~4.9 mL;青霉素、链霉素瓶可酌情少装。

A. 4. 2 把抽取有无菌血液的注射器针头取下,排掉最初 1 滴~2 滴血液,25 mL 培养瓶每瓶滴加 0.1 mL~0.3 mL 血液,盖上瓶盖,摇匀。

A. 4. 3 培养按 A. 3. 5 的规定执行。

A. 5 收集细胞、低渗、固定、滴片、染色

分别按 7.2.8~7.2.12 规定执行。

附录 B
(资料性附录)
显微摄影的有关事项

B. 1 显微镜的调节

B. 1. 1 把 10×物镜旋入光路中, 调节双目镜筒使两目镜间距离符合使用者两眼间距离, 再调节调焦取景目镜光度视力调节环至调焦标志成像清晰; 然后用粗细调焦钮把标本的像调焦清晰, 确定染色体目标, 在 20×物镜下进一步确定位置, 在 100×油镜调清晰后拍照。

B. 1. 2 聚光镜调中, 关小视场光栅, 升降聚光镜使所得到的多边形的视场光栅像清晰, 再用聚光镜上的调中旋钮将视场光栅调至视野中央, 开大视场光栅后进一步调中至与视野圆周内接, 继续开大光栅至视野外切, 即稍大于视野。

B. 1. 3 将孔径光栅开至与物镜的数值孔径(N. A)相应位置: 一般情况下, 聚光镜的孔径光栅应比物镜的孔径光栅小三分之一左右, 才能获得最好质量的像。调换物镜时孔径光栅也应相应调整(聚光镜与物镜数值孔径的匹配是显微摄影的关键操作)。

B. 1. 4 再把标本精确调焦后即可准备拍摄。

B. 2 照相

B. 2. 1 数码显微照相, 用照片纸打印染色体核型图, 根据 8. 2 确定染色体组型。

B. 2. 2 光学显微照相后, 选用 21°黑白感光片、15°左右的胶卷和 4 号相纸洗像。

中华人民共和国
国家标准
养殖鱼类种质检验
第12部分:染色体组型分析

GB/T 18654.12—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号

邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

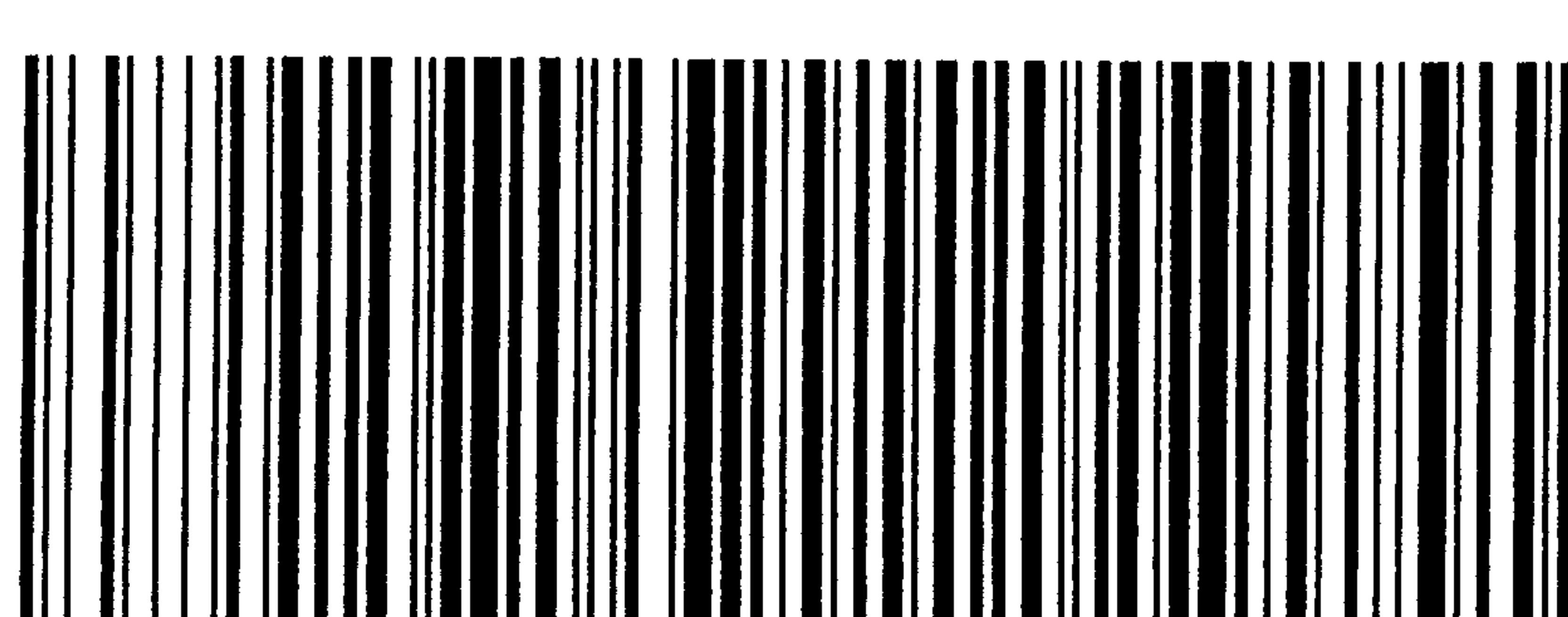
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 15 千字
2008年9月第一版 2008年9月第一次印刷

*

书号: 155066 · 1-33964 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权所有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



GB/T 18654.12-2008