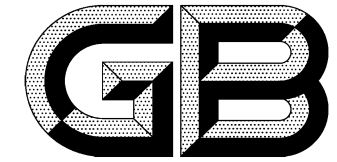


ICS 65.150
B 50



中华人民共和国国家标准

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

GB/T 18654.12—2008

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

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

版权专有 侵权必究

举报电话：(010)68533533



GB/T 18654.12—2008

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

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。

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。

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 μg/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 μg /mL~0.5 μg /mL),于 25℃ 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℃~60℃ 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 μg /mL~50 μg /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。

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