

再刊編號：15
Reprint No.15

抽印自 水產研究
J. Taiwan Fish. Res.
1(2):39-54(1993)

以流式細胞儀判讀人為誘發鯉魚三倍體之探討

趙乃賢·劉富光·黃家富·楊志斌·廖一久

Investigation on Artificially Induced Triploidy in Common Carp Using Flow Cytometer

Nai-Hsien Chao, Fu-Guang Liu, Chia-Fu Huang, Chyh-Ping Yang and I Chiu Liao

農委會補助計畫編號：
80農建-7.1-漁-13(13)

以流式細胞儀判讀人為誘發鯉魚三倍體之探討

趙乃賢¹·劉富光²·黃家富²·楊志斌¹·廖一久¹

摘 要

鯉魚(*Cyprinus carpio*)經由各種方式(如冷擊、高水壓、化學處理)誘發之後，必需經由染色體套數或 DNA 含量和對照組之比對來確認其三倍體率。本實驗室採用的方法有一.染色體圖法(Karyotyping method)。二.銀染法(Silver Staining method)。三.粒度分析儀法(Coulter Counter method)。四.流式細胞儀法(Flow Cytometer method)。前三種方法本實驗室已陸續引進使用並不斷改進中，目前則嘗試使用流式細胞儀作鑑定的工作。此期間不僅從結果分析來推論各種三倍體誘發方法的可行性及其成效，而且和本實驗室曾經採用之其他方法比較優缺點。

流式細胞儀分析法經多方測試，確知其特點為直接測知和 DNA 專用螢光染劑結合之細胞核染色體內之 DNA 含量，而且藉助自動分析之功能，能正確且快速判讀染色體倍數性，值得提供經常且大量測試魚類多倍體之用。有關誘發之結果顯示以 1°C 冷擊處理在不同組得到 66.6，80.4，86.2 及 86.4% 之三倍體鯉魚，而高水壓和高鈣高 pH 化學處理組三倍體率偏低和為零。

緒 言

三倍體魚之特性可應用在許多的方面，如不孕性三倍體草魚可清除水庫中滋長之水草，而不影響水庫中其他生態體系條件。高經濟魚種之一的黑鯛經誘發為三倍體後，可望改善性成熟期之餌料效率低下的問題。另外亦可應用到香魚，以延長其一年魚生命成為二年魚、三年魚。真珠貝等養殖貝類則可以避免植核後母貝在繁殖期間無謂的死亡。由於國內此項研究為時僅數年，三倍體魚的特性與應用仍需作後續的追蹤觀察。若人為誘發三倍體魚經證明是一種有潛力且值得開發的方向，則將來在商業化後，必將面臨染色體倍數性鑑定的問題。如何在掌握結果之正確性與再現性之原則下，開發能快速處理大量樣品的技術，是商業化能否成功的關鍵。另外有關魚類細胞學基礎研究方面，魚類染色體的一些現象如三倍體魚的鑲嵌化(polyploidy/diploidy mosaicism)⁽¹⁾仍需要作更進一步的研究，凡此，需要作染色體及 DNA 含量的鑑定。本實驗室以往採用之方法有：一、染色體圖法(Karyotyping method)。二、銀染法

¹ 台灣省水產試驗所

² 台灣省水產試驗所竹北分所

(Silver-Staining method)。三、粒度分析儀法(Coulter Counter method)。目前則開始採用流式細胞儀法(Flow Cytometer method)。

流式細胞儀是一種細胞自動分析儀，它可以讓我們快速偵測懸浮於液體中個別細胞之各種物理及生化特性。細胞懸浮於液體中逐個高速流向感應區時，會產生電子及光學訊號，這些訊號可能代表螢光強度、光散射、光波吸收或者細胞電阻，可以被準確的測定而且儲存起來。在這種情況下，一些細胞重要的物理或生化特性，如：細胞大小及存活率、核酸的量、酵素或抗原的呈現，均可同時且快速的自大量的細胞中分析獲得。

儀器構造主要由三部分構成：一、液體流動系統，此系統可讓細胞懸浮在液體培養基中，並且逐個快速流經感應區。二、訊號感應區，此系統包括雷射光源(Argon-ion Laser)作為細胞的光散射及螢光的激發，光電管將微弱的光訊號加以放大，然後轉換成電子訊號。三、訊號及數據處理系統，此系統包括一部微電腦及一些軟體程式作分析用。

一般使用染色體圖法，因為需要技術經驗之相當累積方能得心應手，即使是專人專職加上花費甚長的時間亦只能取得數量有限的可計數但不盡完整的染色體展出。銀染法一度曾被引用為最簡單易學可分辨二倍體、三倍體之方法，唯因為銀染後之核仁在顯微鏡下呈黑色，與背景污點每每不能分辨，難免導致模稜兩可之疑惑，因此在文獻索查上使用此法之研究報告一度中斷。粒度分析儀法所分析者為細胞大小，而非細胞內 DNA 含量，因此在判讀三倍體時是一有力的佐證，卻非直接證明，每每在答辯質疑時立場極易遭受攻訐。反觀流式細胞分析儀的使用正可確切地測知已預染螢光之核內 DNA 含量，又由於藉助儀器的功能，可測樣品數量極大，因此能克服前三者的困難，本文即就使用此項高科技儀器解決鯉魚經人為誘發三倍體後建立其判讀方法之心得提出報告。

材料與方法

鯉魚卵以人工繁殖法受精後，為確實掌握在第二極體釋放之前保留，以便達到誘發三倍體之目的，試將受精卵受精之後不同時間(X=1, 3, 5, 7 分等)施予低溫刺激(參考前人實驗，以 1 °C 為主)^(2,4)；壓力刺激(650kg/cm)⁽⁵⁾；或化學刺激(高鈣 Ca=111g/10L，高酸鹼值 pH=10)⁽⁶⁾，並持續不同時間(Y=20-60 分)。然後依批次及不同處理組，分別飼育在塑膠容器並隨體形增大移入較大型塑膠容器或附循環過濾設備之玻璃水槽，每日投予足量鰻魚飼料，直至體長約 5 cm 以上足供一次採紅血球至少一百萬粒以上仍不影響其存活時，才分批次分組採血供試。

一般在鑑定魚類染色體套數所採用的材料是紅血球。本實驗室過去曾嘗試過多種方法，如銀染法係以紅血球為材料，染色體圖法係以胚胎、鰓絲或再生組織為材料，而以粒度分析儀測量細胞體積法係以紅血球為材料。

樣品處理步驟可分為前處理與上機二大項：綜合參考不同醫學檢驗中心的程序⁽⁷⁾

及 Appendix 1 之 Protocols A、B、C，主要步驟詳如下列：

一、前處理：

採血：以 EDTA 為抗凝血劑、心臟採血的方式採到的對照組與試驗組的魚血，立刻分別加入 1% BSA(Bovine-Serum-Albumin)-PBS-0.05% NaN₃ 溶液。

離心：以轉速 1100rpm 離心 5 分鐘，捨棄上清液。目的在去掉 EDTA 及 1% BSA(Bovine-Serum-Albumin)-PBS-0.05% NaN₃ 溶液。

染色：加入 0.1% Triton-X-100，50 μg/ml Propidium Iodide，180 units/ml RNase。

水浴：於 37°C 水浴內培養 20 分鐘。

染色：再加入 0.1% Triton-X-100，50 μg/ml Propidium Iodide，置於 4°C 下一小時，繼續更為完整的螢光染劑與 DNA 之結合作用。

回溫：將樣品回溫後即可上機。

二、上機：

暖機：將機器暖機一小時，目的在使雷射光源的電流穩定。

校正：用校正液(DNA-Check)調整雷射光與待測細胞間之正確位置。

選擇參數：配合染劑 Propidium Iodide 的螢光特性，選擇 FL2-COUNT，FS-FL2，LFL2-COUNT 三個圖形。

條件設定：在採到的血中除紅血球外，有細胞碎屑，血凝塊，及其他組織細胞。所以必須以該流式細胞儀所提供的功能將紅血球與其他細胞區分出來，以便得到正確的結果。調整 Sample flow rate，Sheath pressure，PMT voltage，Amplifier gain 大小，可從 FS-FL2 圖上看出細胞的分布情形。從這個 Dot Plot 上可用機器所提供的功能 Bitmap-Gating 將紅血球的部分獨立出來作分析。當 PMT voltage，Amplifier gain 及 Bitmap-Gating 的位置確定後，即可開始測定樣品了。

開始測試：隨時注意 HPCV 值，勿使超過 5%。

結果與討論

一、前處理：

利用流式細胞儀來鑑定魚類染色體含量可能是一個有效的方法。但是要得到正確的結果則需要有良好的前處理。本實驗有三個不同的前處理方法，Protocol A、Protocol B 與 Protocol C (Appendix 1)。以 Protocol B 與 Protocol C 處理的樣品都能得到良好的結果，而以 Protocol A 處理的樣品經常有 Vortex 無法打散血塊及機器無法偵測到的情形。歸納出其可能原因如下：

A. 離心次數太多，產生血塊。

B. Triton-X-100 濃度太低。

C. Triton-X-100 作用時間太短。

D. 由於 Triton-X-100 作用不足，使得 Propidium Iodide 無法有效的染色。

二、三種三倍體誘發方法成效的比較：

從流式細胞儀得到的數據顯示，迄目前所測試各組中只有以 1°C 冷擊處理的受精卵能得到三倍體的鯉魚，而且比率高達 80 % 以上。另外二種誘發方法：高鈣高 pH 溶液處理、高壓處理沒有誘發成功或成功率偏低。唯，此項結果仍需更多的實驗數據來支持其最後結論(Table 1)。

Table 1. Comparison of three triploid inducement methods in carp.

Inducing methods	group	X~ Y*	2N(no.)	3N(no.)	3N/2N+3N(%)
Cold shock (1°C)	A	1~30	3	19	86.4
	B	1~30	11	22	66.6
	C	3~30	4	25	86.2
	D	3~30	10	41	80.4
High Ca & high pH	A	1~60	30	0	0
	B	1~60	30	0	0
	C	3~60	25	0	0
	D	5~60	30	0	0
	E	5~60	30	0	0
High water pressure (650 Kg/cm ²)	A	5~5	20	0	0
	B	5~10	13	1	7.7

X~Y: X represents time (min) after fertilization; Y represents treatment time.

三、四種鑑定魚類染色體套數方法之比較：

四種鑑定魚類染色體套數的方法，究竟何種能得到最正確的結果，其優缺點分析如下(Table 2)：

(一)染色體圖法：染色體圖法的製作耗時頗長，而且處理過程中所發生的問題，如不同細胞間會有染色體混合，同一細胞內也有染色體重疊的現象，以至於得到不正確的結果。染色體圖法也有類似銀染法樣品數目不大的問題。所以染色體圖法也適合作為一種輔助的方法⁽⁸⁾。但是，若製作技術良好則能得到清晰的染色體圖片及數目，提供最直接之證明。

(二)銀染法：銀染法的製作過程尚稱簡便，但是雜質干擾以及細胞重疊的問題則造成錯誤的結果⁽⁹⁾。另外，由於是以顯微鏡觀察，所以樣品數目並不大。綜合以上因素，以銀染法測定染色體套數可以作為一種輔助的方法。

(三)粒度分析儀法：以粒度分析儀測量紅血球體積大小來推論其 DNA 含量，此種方法有一缺點，在採血的過程中，由於滲透壓的關係，紅血球容易產生體積改變的情形，而影響其可信度⁽¹⁰⁾。但是，粒度分析儀法的樣品數目能夠達到 10,000 個細胞以上，而且，在數分鐘內即可測完，這是粒度分析儀法的優點。

(四)流式細胞儀法：流式細胞儀法是先將細胞染色再由使用流式細胞儀(Flow Cytometer, Profile II; Coulter Co.)去判讀。由於與染色體結合的染劑和染色體含量成正比的關係，所以，能夠將染色體作定量的測定，並與對照組之樣品作比較⁽¹⁰⁾。除了精確之外，前處理簡易，樣品數目能夠達到 10,000 個細胞以上，都是流式細胞儀法的優點。

(五)綜合比較：由於前處理的困難及樣品數目太小的問題使得銀染法及染色體圖法不適合於作大量樣品的處理與分析。而粒度分析儀法及流式細胞儀法則能快速的處理大量樣品。唯，粒度分析儀法由於是以紅血球為材料，在採血的過程中，由於滲透壓的關係，容易產生體積改變的情形，而影響結果的正確性。所以，綜合以上各項可知流式細胞儀法是一種快速且正確的測量染色體的方法。

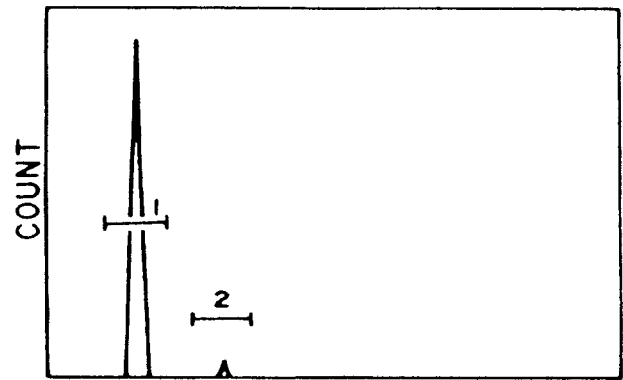
Table 2. Analysis of fishery ploidy determination methods.

	Silver-staining method	Karyotyping method	Coulter counter method	Flow cytometer method
Observational tool	microscope	microscope	Coulter counter	flow cytometer
Objective	numbers of RBC's nucleus forming area	embryo or gill's fiber	size of RBC	DNA amount in RBC's nucleus
Cause for error	impurities or wrong position	overlay or loss	RBC's distortion	wrong position for laser emitting or improper pretreatment
Number of samples	100-200 cells (per slide)	30-100 cells (per slide)	3,100 cells per sec, total count above 20,000 cells	200 cells per sec, total count above 10,000 cells
Treatment time	3 min	3-12 h	3 min per sample	3 min per sample
Observation time	10 min	1 h	7 min per sample	5 min per sample

四、資料分析：

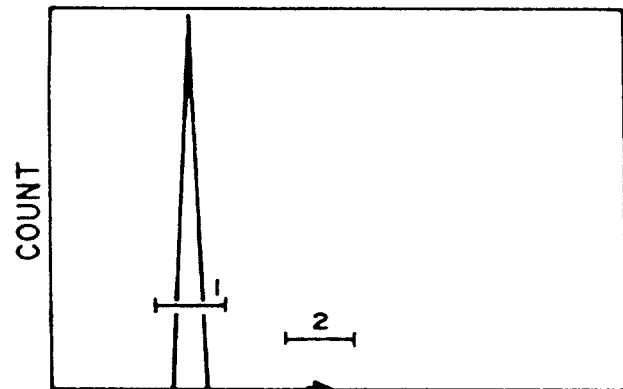
(一) 1°C 冷擊與對照組魚比較(Fig. 1 and Appendices 2&3)

1. 平均值比較：從 FL2-COUNT 圖上，兩個峰(Peak)的位置可以清楚的分辨出二倍體與三倍體的不同。由於三倍體的染色體比二倍體多了二分之一，所以，其螢光強度分別為 57 與 38。



FL2

	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%HPCV
1	27	63	9873	91.9	38.5	1.7	3.31
2	63	91	703	6.5	76.9	2.8	2.96



FL2

	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%HPCV
1	44	74	16316	91.8	57.6	2.5	3.34
2	101	131	765	4.6	114.6	4.3	2.93

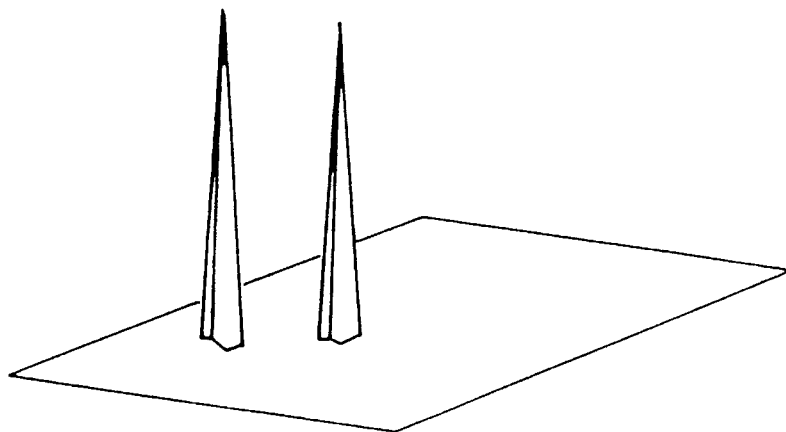
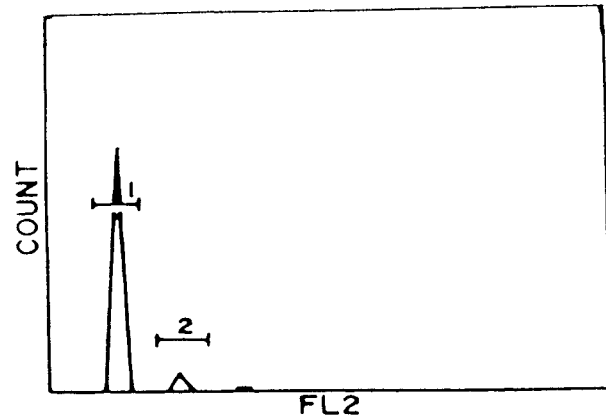
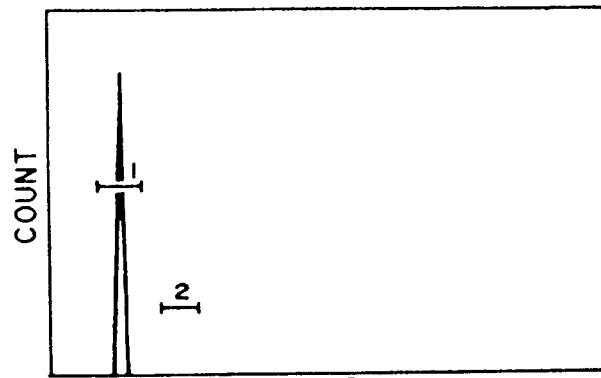


Fig. 1. Ploidy analysis by DNA flow cytometry in cary induced by low temperature shock Treatment.



	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%HPCV
1	20	39	6016	85.1	28.8	1.9	6.56
2	47	70	698	10.1	64.6	3.8	5.4



	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%HPCV
1	22	39	7509	98.6	31.9	1.2	3.67
2	61	69	0.8	0.6	62.6	3.2	1.07

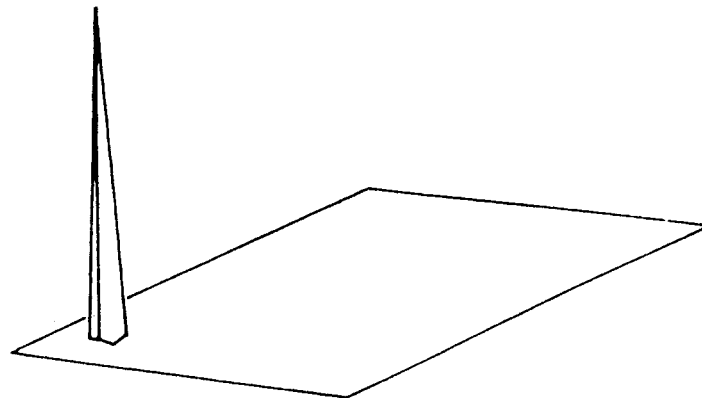
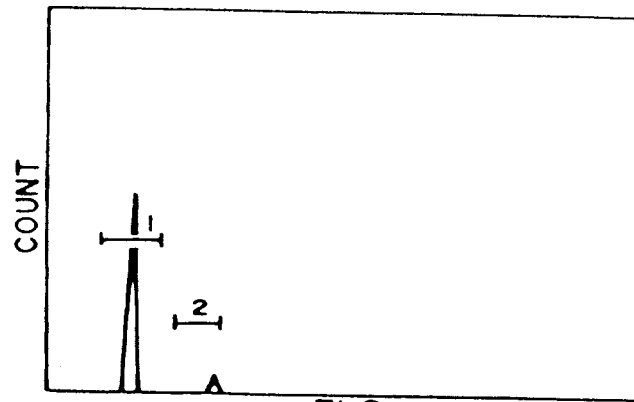
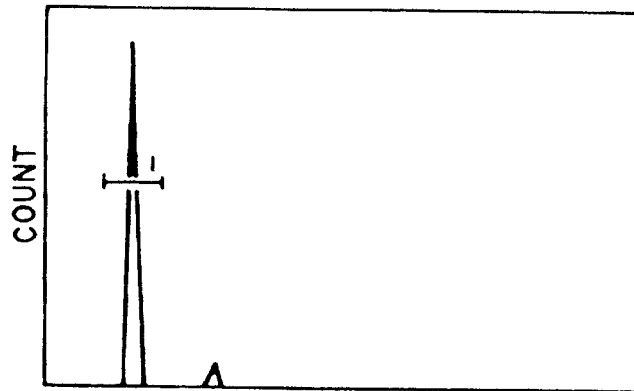


Fig. 2. Ploidy analysis by DNA flow cytometry in carp induced by high hydrostatic treatment.



	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%HPCV
1	18	44	6496	83.8	34	1.8	4.42
2	63	74	924	11.9	69.2	3	3.43



	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%HPCV
1	19	44	8284	86.8	34.8	1.6	3.38

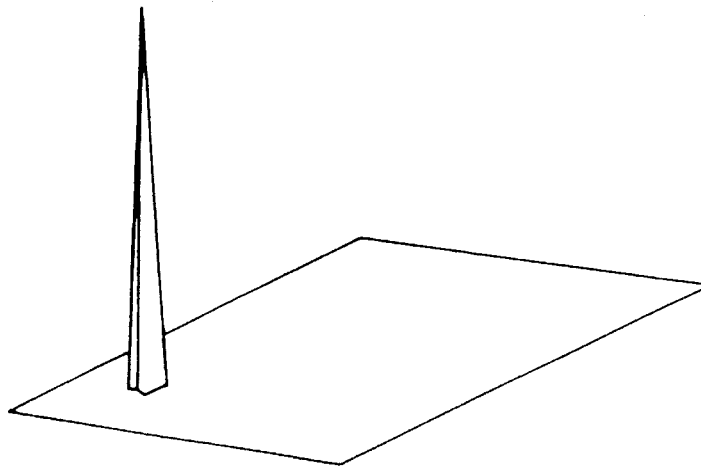


Fig. 3. Ploidy analysis by DNA flow cytometry in carp induced by high Ca-high pH solution treatment.

2.FS-FL2 立體圖比較：二倍體的峰與三倍體的峰很明顯的落在不同的位置，從此圖可以清楚的看出二倍體與三倍體細胞其大小與染色體含量的差別。

(二)以高壓處理與對照組魚比較(Fig. 2 and Appendix 4)

- 1.平均值比較：從 FL2-COUNT 圖上，兩個峰的位置可以清楚的看到，高壓處理與對照組魚其螢光強度並無多大差別，顯示其染色體含量相當。
- 2.FS-FL2 立體圖比較：此圖形是將對照組與測試組的立體圖合併，發現兩者之高峰所在完全重疊，顯示其細胞大小與染色體含量並無差別。

(三)以高鈣高 pH 溶液處理與對照組魚比較(Fig. 3 and Appendix 5)

- 1.平均值比較：高鈣、高 pH 溶液處理魚與高壓處理魚的情形相同，FL2-COUNT 圖顯示其染色體含量與對照組魚相當。
- 2.FS-FL2 立體圖比較：此圖形是將對照組與測試組的立體圖合併，發現兩者之高峰所在完全重疊，顯示其細胞大小與染色體含量並無差別。

謝 辭

本實驗研究承國科會在 NSC 78-0409-B-056-01, 79-0409-B-056-02 及 80-0409-B056-03 及農委會 80 農建-7.1-漁 13(13)研究計劃項下給予經費補助，特此誌之。

染色體之製作方面，由日本北里大學井田齊先生提供甚多參考文獻，並承台中私立中山醫學院李宣佑博士和蔡錦珠小姐給予技術指導。又，流式細胞儀係前往台北榮總醫院一般外科研究室操作，屢蒙吳麗華小姐熱心指導其原理與使用方法，方能有成，一併謹致謝意。

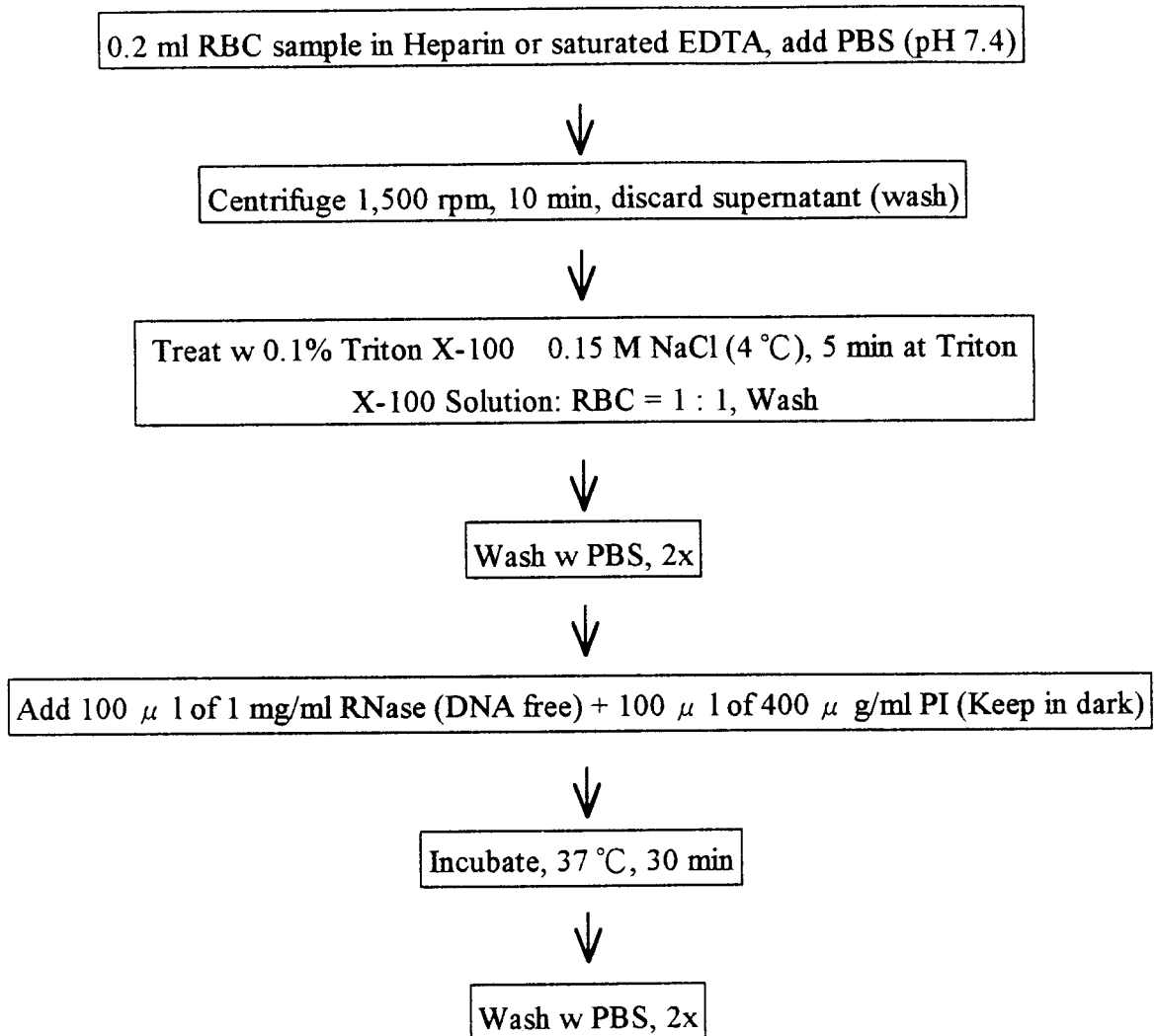
參考文獻

1. Thorgaard, G. H., P. S. Rabinovitch, M. W. Sten, G.A.E. Gall, J. Propp and F.M. Utter (1982). Triploid Rainbow Trout identified by flow cytometry. *Aquaculture* 29: 305-309.
2. Don J. and R. R. Avtalion (1988). Comparative study on the induction of triploidy in tilapia, using cold shock and heat shock techniques. *J. Fish Biol.* 32: 665-672.
3. Chao, N. H., S. J. Chen, and I. C. Liao (1985). Triploidy induced by cold shock in cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. in J.L.Maclean, L.B. Dozon and L.V. Hosillon (eds). *The First Asian Fisheries Forum*, pp 101-104.
4. Ojima, Y. and S. Makino (1978). Triploidy induced by cold shock in fertilized eggs of the carp. *Proc. Jpn. Acad.*, 54: 359-362.

5. Lou, Y. D., and C. E. Purdom (1984). Diploidy gynogenesis induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri Richardson*. J. Fish Biol., 24: 665-670.
6. Ueda, T., R. Sato, and J. Kobayashi (1988). Triploid rainbow trout induced by High-pH, High-calcium. Nippon Suisan Gakkaishi 54(11): 2045.
7. Allen, S. K. (1983). Flow Cytometer: Assay of polyploid fish and shellfish. Aquaculture. 33: 317-328.
8. Suzuki, R., T. Nakanishi, and T. Oshiro (1985). Survival, growth and sterility of induced triploids in the cyprinid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 51(6): 889-894.
9. 容壽柏，陳毅恆，劉紹瓊，林昌勻，王春鋒，范佛(1990).用銀染法鑑定革胡子鯰胚胎的倍性. 淡水漁業 4: 14-15.
10. Johnson O. W., P. R. Rabinovich and F. M. Utter (1984). Comparison of the reliability of a Coulter Counter with a flow cytometer in determining ploidy levels in pacific salmon. Aquaculture. 43: 99-103.

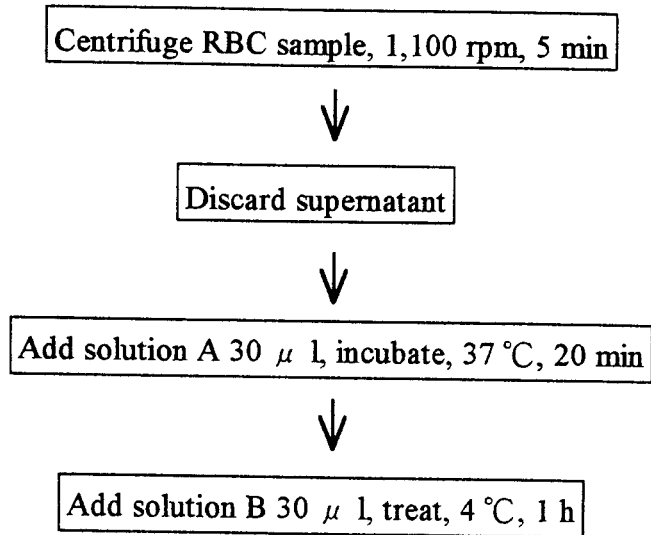
Appendixes

(Protocol A)



Appendix 1.

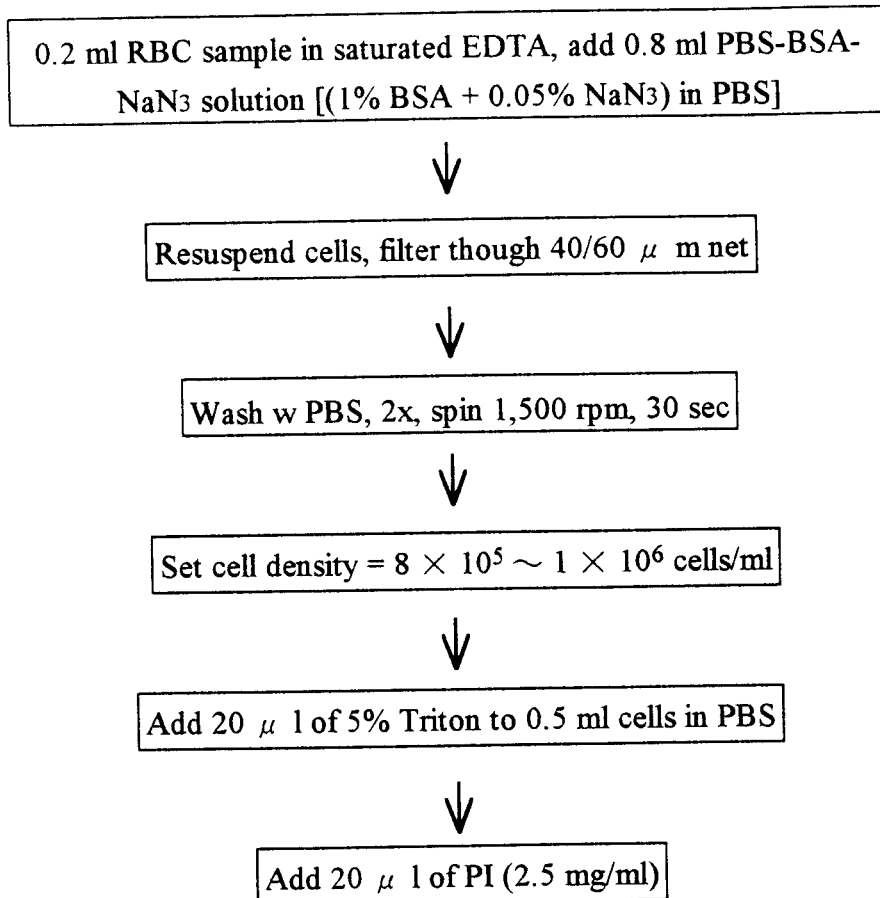
(Protocol B)



Solution A	Solution B
0.5 ml PI Stock solution	0.5 ml PI Stock solution
0.5 ml RNase stock solution	0.1 ml Triton X-100 stock solution
0.1 ml Triton X-100 stock solution	9.4 ml 0.4 M NaCl solution, adjust to pH=7.2

Appendix 1. (Continued).

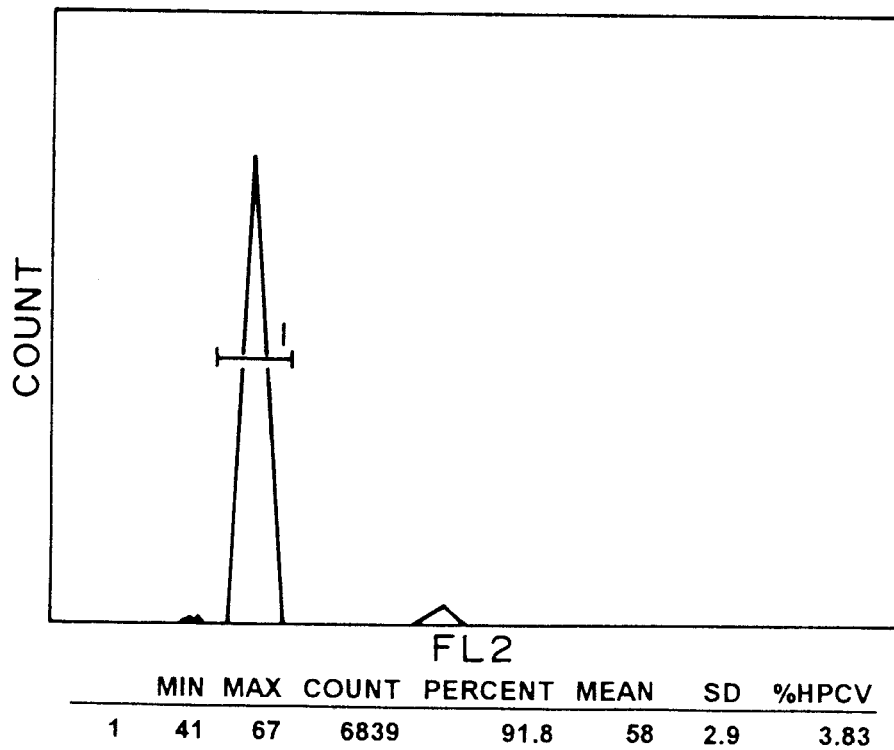
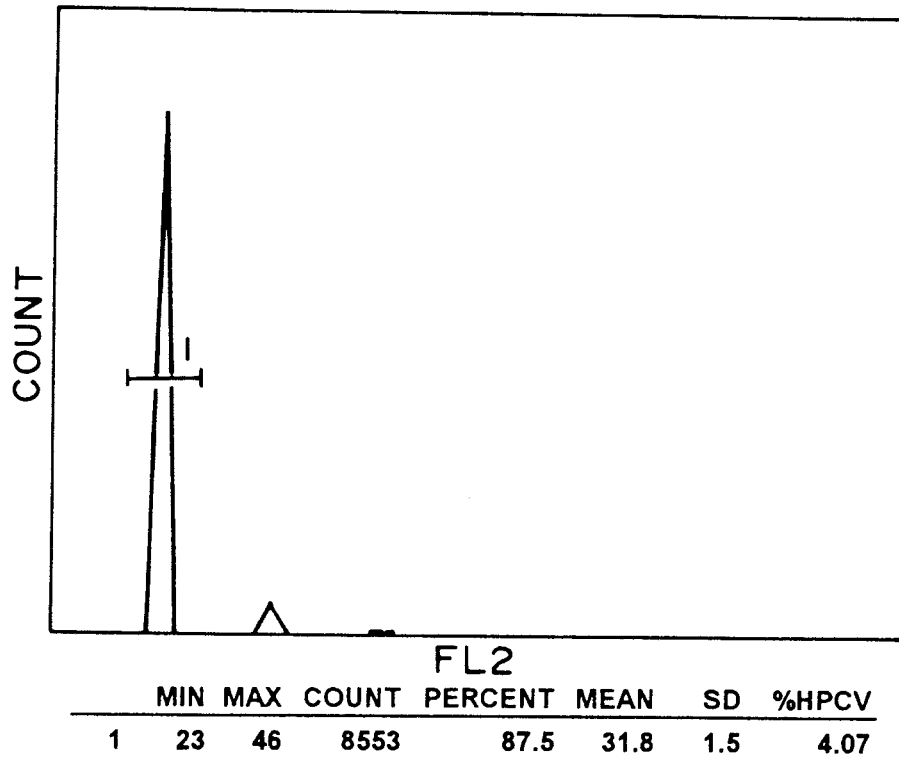
(Protocol C)



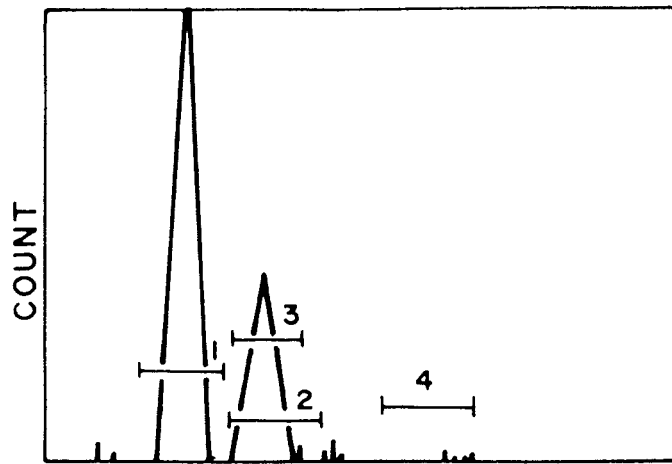
EDTA : Ethylenediamine tetracetic acid

PI : Propidium iodide

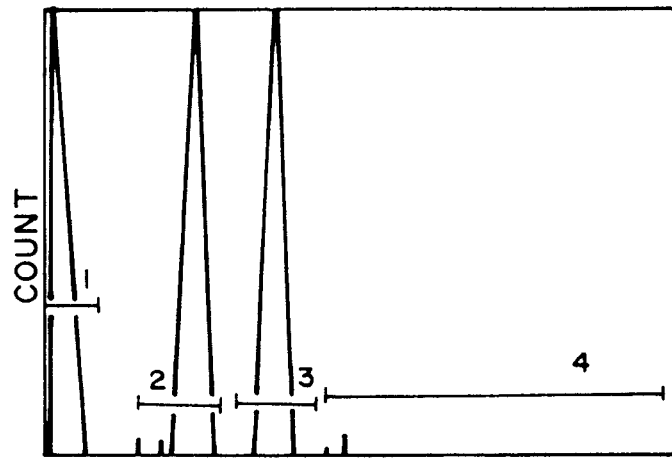
Appendix 1. (Continued).



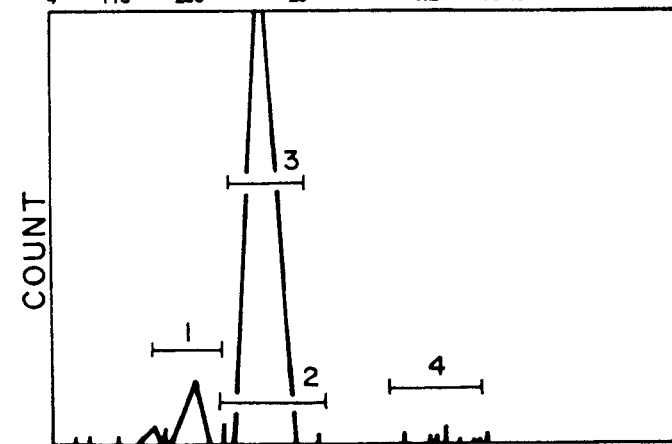
Appendix 2. Cytometry test results of bitmap gating and fluorescence intensity in carp groups of control and cold shock with 1 °C showing roughly 150% DNA content in later group when compared to control group.



	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%HPCV
1	39	88	1201	20	55.2	3.8	6.31
2	89	119	191	3.2	95.1	8.4	2.71
3	70	100	403	6.7	86.1	5.3	2.67
4	134	172	8	0.1	161.9	6.3	0.27

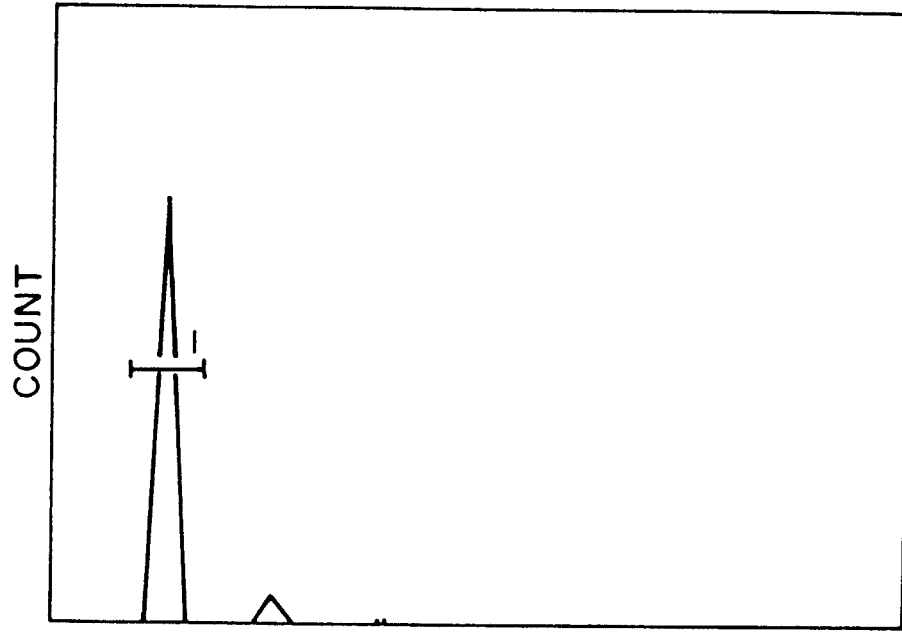


	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%HPCV
1	0	10	12295	90.2	2	0.5	22.4
2	31	72	719	5.3	59.5	4.2	2.6
3	77	105	579	4.2	92.4	2.7	2.05
4	113	255	29	0.2	134.6	31.2	1.06



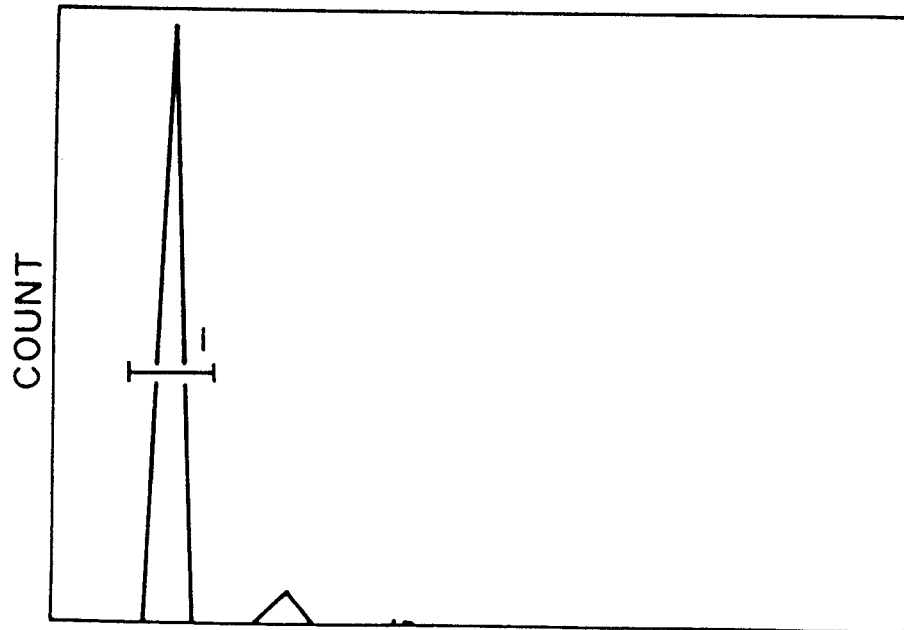
	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%HPCV
1	39	88	138	2.3	53	6	6.43
2	89	119	149	2.5	90.8	4	6.53
3	70	100	1296	21.4	83.8	4	5.09
4	134	172	18	0.3	153.6	8.1	0.34

Appendix 3. Cytometry test results of bitmap gating and fluorescence intensity in sample combination groups of RBC cells from 2N and 3N carp at three various ratio of 2:1, 2:2 and 2:4 the show the cell count of 3N increased as its ratio increased.



FL2

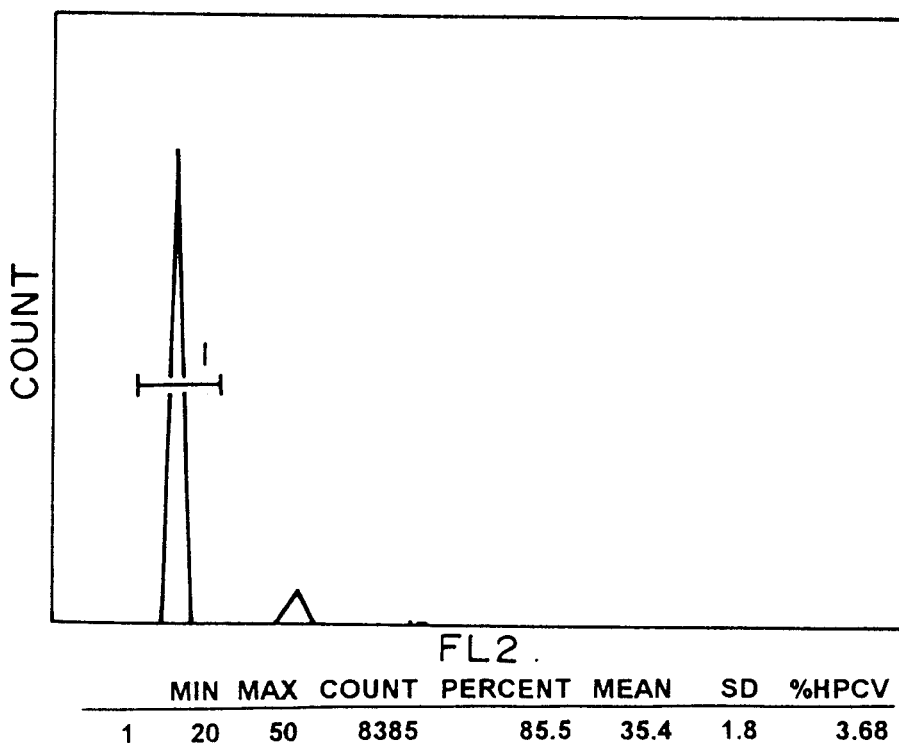
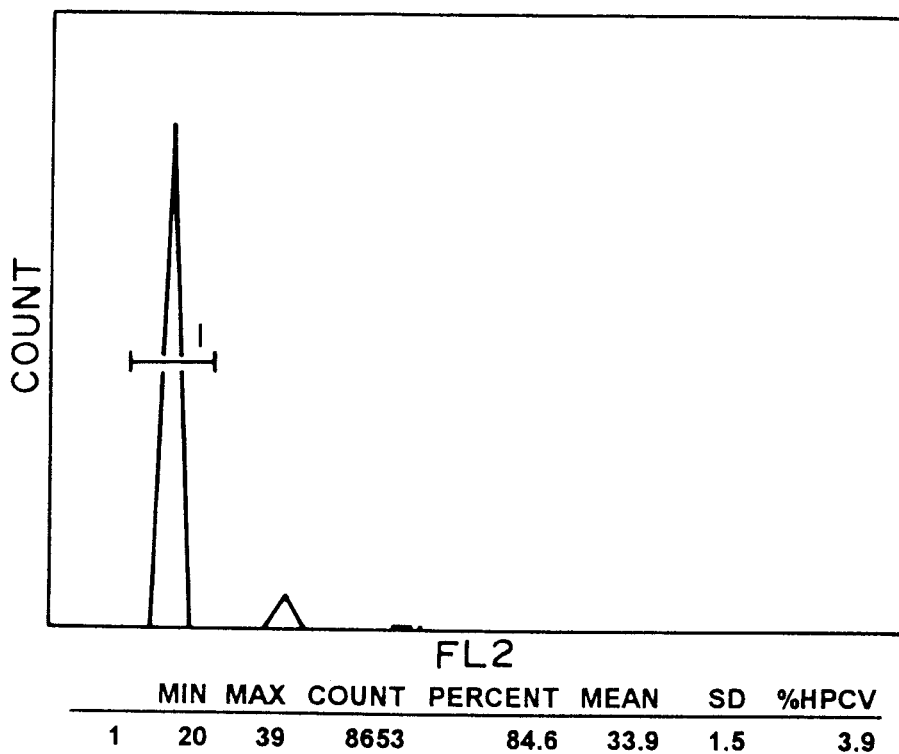
MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%HPCV
1	23	42	87.2	32.3	1.8	4.84



FL2

MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%HPCV
1	20	45	89.5	33.4	2.3	5.33

Appendix 4. Cytometry test results of bitmap gating and fluorescence intensity in carp groups of control and hydrostatic pressure shock with 650 kg/cm² showing no increment of DNA content in later group when compared to control group.



Appendix 5. Cytometry test results of bitmap gating and fluorescence intensity in carp groups of control and high Ca-high pH solution treatment at 1,110 mg CaCl₂/100 ml H₂O and pH=10 showing no increment of DNA content in later group when compared to control group.

Investigation on Artificially Induced Triploidy in Common Carp Using Flow Cytometer

Nai-Hsien Chao, Fu-Guang Liu, Chia-Fu Huang,
Chyh-Ping Yang, I-Chiu Liao

ABSTRACT

After the induction of triploidy in carp (*Cyprinus carpio*) by cold shock, chemical shock, or hydrostatic shock, the identification of triploidy presence using flow cytometer to determine DNA content was developed and compared with three other methods including karyotyping method, silver staining method and Coulter counter method, which were previously used in our laboratory.

Three major protocols A, B and C adopted for pretreatment of red blood cells were found feasible and practical with stepwise improvement of easy manipulation. The treated RBC samples were run in flow cytometer allowing the sample injection at optimum flow rate (15-30ul/min), sheath pressure (7.51 ~ 15.00PSI) and laser power (0.15MV and 8.62A) to obtain better half peak coefficient of variation (< 5 %) and histograms of fluorescence intensity from RBC stained with PI (Propidium Iodide). The histograms were analyzed using the supplied DNA analysis program and a recommended software.

The results indicated that the flow cytometer has the advantages of being accurate and capable of checking more than 10,000 cells within 3 min. In this study, cold shock of 1 °C resulted in triploidy of 66.6, 80.4, 86.2 and 86.4 % in various experimental groups, while high Ca, high pH solution treatment and hydrostatic pressure shock gave poor production of triploidy.