

■ 高等学校研究生试用教材

植物分子细胞遗传学实验

王小利 张改生 李红霞 编著



上海科学技术出版社

高等学校研究生试用教材

植物分子细胞遗传学实验

王小利 张改生 李红霞 编著

上海科学技术出版社

图书在版编目 (C I P) 数据

植物分子细胞遗传学实验 / 王小利, 张改生, 李红霞编著. -- 上海: 上海科学技术出版社, 2010. 8
ISBN 978-7-5478-0402-5

I. ①植… II. 王… ②张… ③李… III. ①植物学:
分子遗传学: 细胞遗传学-实验-研究生-教材 IV.
①Q943-33

中国版本图书馆CIP数据核字 (2010) 第126302号

上海世纪出版股份有限公司 出版、发行
上 海 科 学 技 术 出 版 社
(上海钦州南路71号 邮政编码 200235)

新华书店上海发行所经销
上海宝山译文印刷厂印刷
开本 787×1092 1/16 印张: 9.25
字数: 200千字
2010年8月第1版 2010年8月第1次印刷
ISBN 978-7-5478-0402-5/S·9
定价: 25.00元

本书如有缺页、错装或损坏等严重质量问题,
请向工厂联系调换

前言

FOREWORD

植 物 分 子 细 胞 遗 传 学 实 验

《植物分子细胞遗传学实验》是一本试用教材,专供高等农林院校的作物学、园艺学、林学、植物保护学、植物学以及草业学和种子学等有关专业研究生开设“植物细胞遗传”或“植物分子细胞遗传”实验课用,也可供有关专业及从事植物遗传育种的广大科研工作者参考;对高等专科学校、示范专科学校有关专业师生也有一定参考价值。

本书包括十八个实验,从植物分子细胞遗传学需要掌握的最基本实验技能,如植物染色体制片、观察,各种染色体数量、结构变异的形态特点,分带技术,到分子细胞遗传学所涉及的最基本前沿,如植物染色体DNA提取、分子标记、原位杂交,以及植物外源染色体片段的分子、生化鉴定、cDNA文库构建等领域都已涵盖,是作者长期进行研究生植物细胞遗传学教学的一个浅显积淀。现将其编著成书,一方面旨在自我提高,另一方面以飨读者,旨在与同领域学者共勉!

由于我们经验不足,理论水平有限,某些实验的安排、设计和编写可能有不妥之处,敬请读者不吝指正。

编著者

2010年7月于杨凌,西北农林科技大学

目 录

CONTENTS

植 物 分 子 细 胞 遗 传 学 实 验

□ 实验一	植物有丝分裂制片	1
□ 实验二	植物减数分裂制片	12
□ 实验三	植物染色体组型分析	16
□ 实验四	植物中的超数染色体观察	20
□ 实验五	植物染色体结构变异观察	23
□ 实验六	非整倍体染色体观察和鉴定	33
□ 实验七	减数分裂中期 I 染色体构型观察	39
□ 实验八	植物单倍体的诱导与染色体加倍	44
□ 实验九	植物染色体分带技术	52
□ 实验十	植物总 DNA 提取与定量	58
□ 实验十一	植物染色体原位杂交技术	66
□ 实验十二	小麦近缘植物特异性 PCR 标记	76
□ 实验十三	利用 SSR 标记鉴定外源染色体	86
□ 实验十四	利用 DNA 分子杂交鉴定外源染色体	92

目 录

CONTENTS

植 物 分 子 细 胞 遗 传 学 实 验

□ 实验十五	利用酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术鉴定外源醇 溶蛋白基因	102
□ 实验十六	利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术鉴定外源 HWG 基因	107
□ 实验十七	同工酶技术在鉴定小麦外源染色体中的应用	115
□ 实验十八	抑制消减杂交技术在小麦 cDNA 文库构建中的 应用	119
□ 附 录	实验室常用试剂的配制	131
□ 主要参考文献		141

1

实验一

植物有丝分裂制片

一、实验目的

- (1) 学习植物根尖有丝分裂制片技术。
- (2) 了解和辨别有丝分裂各个时期的染色体特征。
- (3) 掌握植物染色体的观察与计数方法。

二、实验原理

有丝分裂(mitosis)是植物体细胞增殖的重要方式。以有丝分裂方式增殖的细胞从一次分裂结束到下一次分裂结束所经历的过程包括间期和有丝分裂期两个阶段。细胞在进行有丝分裂时,细胞核和细胞质都将发生形态上的变化,尤其是细胞核内染色体所发生的有规律的和准确的分裂过程,称其为有丝分裂期,两次有丝分裂之间称为有丝分裂间期。

(一) 间期(interphase)

细胞生命活动大部分时间是在间期度过的,间期是细胞合成 DNA、RNA、蛋白质和各种酶的时期,是为细胞分裂准备物质基础的主要阶段。间期合成 DNA 的时期称 S 期;S 期后和分裂期(M)之间有一个间隙不合成 DNA,称为 G_2 期;在 M 期后和 S 期之间另有一个间隙,也不合成 DNA 称 G_1 期。

G_1 期 进行大量物质合成时期。细胞体积逐渐增大,生成 RNA。RNA 的合成又导致结构蛋白和酶蛋白的形成,这些酶又控制着形成新细胞成分的代谢活动。 G_1 期持续时间变异很大,多数细胞的 G_1 期较长,是与细胞需要增加质量有关。

G₀期 细胞周期的调节主要是通过 G₁ 期的阻留而实现的, G₀ 期即指细胞处于阻留的状态。细胞通过 M 期一分为二, 有的可继续分裂进行周期循环, 有的转入 G₀ 期。G₀ 期是脱离细胞周期暂时停止分裂的一个阶段。但在一定适宜刺激下, 又可进入周期。

S 期 在这一阶段完成 DNA 的合成以及合成与 DNA 组装构成染色质等有关的组蛋白。DNA 含量在此时期增加一倍。S 期终结时, 每一染色体复制成两个染色单体。

G₂ 期 是 DNA 复制结束和开始有丝分裂之间的间隙, 在这期间细胞合成某些蛋白质和 RNA 分子, 为进入有丝分裂提供物质条件。G₂ 期合成的是染色体浓缩以及形成有丝分裂期所需的成分。有人认为 G₂ 期继续完成从 S 期就开始的微管蛋白的合成, 为 M 期纺锤丝的组装提供原料。在 G₂ 晚期开始合成有丝分裂因子。

细胞周期中, 细胞形态也发生一系列变化。G₁ 期细胞最小, 细胞扁平而光滑; 随着向分裂期的发展, 细胞逐渐增大, 从扁平变成球形。细胞周期中的许多生化事件是按一定顺序有条不紊地进行着, 这和基因按一定顺序表达密切相关。

以上几个时期的长短因物种、细胞种类和生理状态不同而不同。一般 S 期较长, 占间期的一半, S 期长短较稳定; G₁ 和 G₂ 期较短, 变化较大, 但也有 G₂ 期较长者。下表是小麦、大麦、蚕豆等分生组织细胞有丝分裂周期各阶段的持续时间(h)。

植 物	有丝分裂持续时间(h)					
	G ₁ 期	S 期	G ₂ 期	有丝分裂 M 期	分裂周期	温度(℃)
普通小麦	2.8	5.3	2.5	0.4	11.0	25
大 麦	1.9	4.5	3.0	1.0	10.4	25
蚕 豆	2.4	4.0	8.0	3.6	18.0	20

(二) 分裂期

有丝分裂是一个连续的过程, 为了描述方便起见, 习惯上按先后顺序划分为前期、中期、后期和末期四个时期, 在前期和中期之间有时还划分出一个前中期。

前期(prophase) 自分裂期开始到核膜解体为止的时期。间期细胞进入有丝分裂前期时, 核的体积增大, 由染色质构成的细染色线逐渐缩短变粗, 形成染色体。因为染色体在间期中已经复制, 所以每条染色体由两条染色单体组成, 核仁在前期的后半期渐渐消失。在前期末核膜破裂, 于是染色体散于细胞质中, 染色体向赤道面运动。

中期(metaphase) 从染色体排列到赤道面上, 到它们的染色单体开始分向两极之前, 这段时间称为中期。中期染色体浓缩变粗, 显示出该物种所特有的数目和

形态。

后期(anaphase) 每条染色体的两条姊妹染色单体分开并移向两极的时期。分开的染色体称为子染色体,子染色体到达两极时后期结束。子染色体向两极的移动是靠纺锤体的牵引活动实现的。

末期(telophase) 从子染色体到达两极开始至形成两个子细胞为止称为末期。此期的主要过程是子核的形成和细胞的分裂。子核的形成大体上是经历一个与前期相反的过程,到达两极的子染色体首先解螺旋而轮廓消失,其周围集合核膜成分,融合而形成子核的核膜,核内出现核仁。高等植物细胞的胞质分裂是靠细胞板的形成,细胞板逐渐扩展到原来的细胞壁乃把细胞质一分为二。

可见,有丝分裂的结果,母细胞与子细胞之间以及子细胞与子细胞之间,染色体的组成与数目完全相同。因此遗传物质在世代间及同一世代不同细胞间的传递必然与染色体的准确复制和均等分配有关,在遗传育种实践中染色体的形态、数目、组型分析及带型分析等,主要是通过对有丝分裂染色体的观察进行的,因此必须学会会有丝分裂制片技术,掌握辨认有丝分裂各时期特征及染色体计数的方法。

许多理化因素都影响有丝分裂过程,对于植物和低等动物的细胞,在一定范围内(8~25℃)温度越低,细胞周期越长,有丝分裂过程也越慢。接近 0℃ 的低温可抑制纺锤体的形成,使细胞受阻在有丝分裂中期。电离辐射,如 α 射线和 γ 射线能抑制细胞进入有丝分裂。许多化学药物,如秋水仙素、对二氯苯等都有抑制有丝分裂的作用。促进有丝分裂的化学物质有植物凝集素、赤霉素等。

三、实验材料

小麦、黑麦、大麦、豌豆的种子。

四、实验仪器与试剂

(一) 仪器设备及用品

显微镜,载玻片,盖玻片,电子天平,培养箱,制冰机,电冰箱,试剂瓶,玻璃棒,剪刀,培养皿,酒精灯,火柴,小标签,吸水纸,刀片,解剖针,纱布,铅笔。

(二) 所需试剂

无水乙醇,冰乙酸,洋红,地衣红,碱性品红,苯酚,偏重亚硫酸钠,盐酸,无水亚硫酸氢钠,苏木精,铁钒(硫酸铁铵),秋水仙素,二氯苯, α -溴萘,8-羟基喹啉,放线菌酮等。

(三) 试剂配制

- (1) 70%乙醇;
- (2) 45%冰乙酸;
- (3) 1%~2%的醋酸洋红染色液;
- (4) 卡诺氏固定液;
- (5) 地衣红染色液;
- (6) Schiff 试剂;
- (7) 石炭酸(苯酚)品红染色液;
- (8) 苏木精染色液;
- (9) 1 mol HCl 溶液;
- (10) 0.01%~0.2%秋水仙碱水溶液;
- (11) 0.002 mol 8-羟基喹啉。

五、实验步骤

(一) 取材

原则上讲,凡是进行细胞分裂的分生器官、组织甚至单个细胞,都可进行染色体观察。但不同的材料得到分裂细胞的几率差异很大。

1. 根尖

大部分农作物都易获得种子或鳞茎、块茎等营养器官。这类作物最好用根尖为材料。根尖取材方便,分生区集中且容易判断,也不受季节影响。根尖的取材,除了应特别注意提供良好的萌根条件外,还需注意根的生长特点,以求适时取材。具体地讲,一般禾本科作物或其他单子叶植物的种子或鳞茎等营养器官(例如洋葱、大蒜等),根长 0.5~2 cm 时取材较为适宜,此时的细胞分裂指数最高。而许多双子叶植物(例如蚕豆、豌豆、花生、棉花、黄瓜等)则不然,在种子萌发的初始阶段,主要是胚轴细胞的伸长,根尖细胞分裂极少,而且常有大量淀粉存在而干扰后续的操作。通常大、中型种子,以种子根长 2~4 cm,小型种子(白菜、芝麻等)根长 0.5~1.5 cm 时,细胞分裂指数最高,取材最适宜。从种子根或主根上萌生的侧根也常用作观察染色体的材料,虽然其细胞分裂指数一般不及主根高,但细胞质或贮藏物则通常比主根稀少,黏滞度低,比主根更易于获得平整而清晰的染色体图像。对大多数植物而言,种子用消毒过的、湿度适宜的细砂土或蛭石为基质培养萌根最为理想,可以获得较优质的根尖材料。所以,重视根的生长条件及根尖生长和细胞分裂的特点,是根尖取材中切不可忽视的重要环节。

蚕豆等几种材料的培养条件如下表。

材 料	培 养 条 件
蚕 豆	当年的种子充分浸种,发芽后埋在干净的湿沙团中,20~22℃培养,根长达1~1.5 cm时,可进行前处理
大麦、小麦	种子浸种后,放在具有湿滤纸的培养皿于20~25℃中培养,根长达0.4~1.5 cm时,进行前处理
洋 葱	鳞茎放在盛水的染色缸上,置于20℃中(黑暗中)培养,待根长至1 cm左右,切下进行前处理

2. 茎尖和幼叶

茎尖和幼叶在作为观察染色体的材料方面,其价值比根尖逊色得多。只有在无法或难以获得根尖的条件下,才用茎尖和幼叶,例如果树类。茎尖和幼叶的取材最不方便之处是受到生长季节的限制,其次是其细胞分裂指数一般较根尖低,又由于有不同的非分生细胞或贮藏物或分泌物的干扰,因此,通常不适合用压片法制作染色体制片而只宜用去壁低渗-火焰干燥法。当然,许多草本类作物例外,尤其是禾本科作物和许多蔬菜作物,用茎尖和幼叶在制片操作上不存在困难。某些不育的杂种,可考虑取茎尖和幼叶为材料。茎尖和幼叶的取材,最宜在抽芽的阶段进行。取材时,茎尖和幼叶其实难分,也不必分开;一旦幼叶可轻易分离时,幼叶已嫌老化了。野外从植株上取下茎尖,应存放在潮湿的塑料袋或培养皿中。如果芽失水萎蔫,将严重影响细胞的正常分裂。要尽可能多地剥除外部的幼叶片,一般留芽长在0.5 cm之内即可,如果芽较大,要用刀片纵向切开;芽较小,则用刀片将芽端部的幼叶尖横切除去,以利预处理药物的渗入。幼芽的分生细胞主要在生长锥、叶原基和幼叶的基部,其他部分均以切除为宜。

3. 幼小花蕾

与茎尖相比,幼小花蕾往往更有价值。所谓幼小花蕾是指处于花粉母细胞减数分裂之前的花蕾,有用部分是花药和子房。此时的花药药壁细胞和孢原细胞以及子房壁、胚珠的细胞都在进行有丝分裂,且组织幼嫩而无其他老化细胞的干扰。如取材适宜,其细胞分裂指数往往高于根尖,如芍药、牡丹、月季等花卉。幼小花蕾取材较茎尖容易,取花蕾用刀片从中部纵向一切为二或四,即可进行预处理,待制片操作时再取用花药和子房。

4. 愈伤组织

研究愈伤组织细胞中的染色体,比上述材料都困难。一是分裂的细胞和老化的细胞混杂;二是细胞的分裂活动因植物不同和培养条件不同变异较大,要做到准确取材相当困难。原则上讲,一般应以转移到新的培养基后愈伤组织细胞大量增殖时取样为宜。取样时应在解剖镜下仔细选择幼嫩的分生细胞团进行处理,采用培养的试管苗也一样,不是随意取来便可观察染色体。只有仔细观察确认根尖仍在伸长时方可取样。否则,往往

是毁了材料而又难以成功。

(二) 预处理

预处理的作用有两方面：其一，是抑制微管蛋白组装成纺锤丝，但并不抑制前期的细胞分裂；因此进入分裂中期的染色体均被阻止而不能进入分裂后期，这样便可以积累大量处于分裂中期的染色体；其指数往往比对照高几倍甚至十几倍。其二，可以诱导染色体进一步缩短变直，便于染色体分散而使染色体形态更加清晰。

1. 冰冻处理

适当的低温，也可抑制微管蛋白组装成纺锤丝。但适用的植物较少，主要是一些麦类作物，如小麦、大麦、黑麦等，在 $1\sim 4^{\circ}\text{C}$ 低温下，处理 $24\sim 36\text{ h}$ ，离体或非离体处理均可。水稻和玉米也有报道用低温处理的，温度为 $6\sim 8^{\circ}\text{C}$ ，不过，应用者较少。不同的材料，因染色体数目的不同，可适当调整处理时间。

2. 药物处理

(1) 秋水仙素(colchicine)：常用浓度为 $0.05\%\sim 0.2\%$ 的水溶液。在照光和高温下，溶液易分解而失效，故宜用棕色试剂瓶分装，冰箱中保存。最好每次处理均用新配制的溶液，比较可靠和便于保持处理条件的稳定性。该药物的适用面最广，对具大、中、小型染色体的各类植物都适用，而且效果明显。但是，因为对不同材料，其最适浓度和处理的持续时间也往往不同，在使用中有两个可变因素存在，所以，常需进行多次试验，才便于找出最佳浓度和最佳的处理持续时间。

各种材料都可用剪下的根浸入秋水仙素溶液进行处理，如下表。

材 料	秋水仙素浓度(%)	处理时间(正常日时)
蚕 豆	0.05	14:30~17:30
大 麦	0.05	8:00~11:00
小 麦	0.1	10:00~14:00
洋 葱	0.2	8:00~12:00

(2) 对二氯苯(p-dichlorobenzene, 简称 pDB)：为无色结晶，具特殊臭味，常温下即可升华，有毒。作为预处理药物是用其饱和水溶液，适用于具大、中、小型染色体的植物；尤其适用于对染色体的计数研究，因为经此药物处理后，染色体易于分散。所以，近年应用者日趋广泛。处理的温度以 $10\sim 20^{\circ}\text{C}$ 为宜，高温往往易诱发染色体发生黏连。

(3) 8-羟基喹啉(8-hydroxyquinotine)：为白色结晶或粉末，易溶于乙醇而难溶于水。通用浓度为 0.002 mol/L 的水溶液。该处理液最适宜用于具中、小型染色体的植

物。它比对二氯苯作用缓和,显示缢痕清晰是其最大优点,总体而言优于其他药物。

(4) α -溴萘(α -bromonaphthalene): 作为预处理液是用其饱和水溶液,一般现用现配最好,极为方便。该药物较适宜用于禾本科和水生植物的预处理,其他植物应用较少。用作非离体处理比离体处理效果好。

(5) 放线菌酮(cycloheximide): 是一种作用快速而有效的蛋白质合成抑制剂,它可以导致分裂前期的染色体超期集缩,也可抑制微管蛋白的合成和组装成纺锤丝。该作用特点可以使供计数的染色体数目细胞数倍增。这对杂种或组培材料的染色体数目变异的统计极为有利。是一种值得进一步试验和研究的新预处理药物。该处理液所需浓度较低,一般为 $(20\sim 50)\times 10^{-6}$ (ppm)。

3. 预处理方法

(1) 离体处理: 即将器官或组织从母体上切割下来进行处理。这是应用最多的一种方法,由于药物很容易从切口渗入分生组织细胞,因而其作用迅速,可在较短时间内完成预处理过程,这是其优点。

(2) 非离体处理: 主要是根尖材料,例如许多蔬菜和花卉的种子很小,根也小,为操作方便,常作非离体处理。另一类是染色体较大的植物,例如百合、贝母、松等,切下根尖处理时,时间太短,则染色体缩短不够;时间太长,又导致细胞失活,难以获得良好的预处理效果,也宜用非离体作长时间处理。由于这种处理方法,根尖可以保持较长时间的正常生活状态,耐药物毒害的能力也强,因此它不像离体处理那样要求条件严格。

(三) 固定与解离

固定的目的是将生活细胞杀死,以保持染色体的固有形态和结构。此外,还可增加细胞的透性和易于染色。乙醇和甲醇可迅速透入细胞而使细胞失活、硬化,并可溶解部分脂类物质。冰乙酸能凝固核蛋白,且穿透力强,并可使细胞软化,为固定染色体的主要成分。

1. 固定

经预处理的材料,冲洗干净以后,用卡诺氏(Carnoy)固定液在温度为 20°C 以上固定24 h。如固定的材料不立即制片,可换入70%乙醇放冰箱保存。

2. 解离

有些压片方法,需要植物根尖分生组织经过解离,以便除去细胞之间的果胶酶层并使细胞壁软化,染色体分散。解离常用酸解法和酶解法。

(1) 酸解法: 固定好的材料,冲洗干净以后,放入已预热至 60°C 的 1 mol HCl 中,并在 $60\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的水浴中保温 $5\sim 20\text{ min}$,时间随材料的大小和染色体的大小而变动。

(2) 酶解法: 用 $10\sim 20\text{ g/L}$ 的果胶酶,或与 $10\sim 50\text{ g/L}$ 的纤维素酶混合使用,均可将植物组织解离。

蒸馏水

100 ml

(6) 蒸馏水洗 5~10 min。

(7) 用 45% 乙酸压片。如着色太淡, 可用 1% 乙酸洋红或地衣红压片, 可使着色加深。

孚尔根染色法的优点是: 可以一次完成大量样品的染色而且染色均匀一致, 细胞的背景无色而染色体清晰。它的主要缺点是: 染色体通常较软而不易分散, 对小染色体的染色往往不及其他染色法染色深重而易于观察和照相。根据以上特点, 孚尔根染色法比较适用于具大、中染色体的染色。但前提是染色体预处理适当, 染色体易于分散, 否则较难获得良好的效果。

4. 卡宝品红(石炭酸品红)染色压片法

卡宝品红是目前国内应用最广的一种植物染色体染色剂。它既具有孚尔根染色法分色清晰的优点, 又具有乙酸洋红或地衣红的染色操作简便、快速的特点。此外, 染色剂的耐保存和稳定性以及制片后颜色的耐久不褪色等优点, 都是前两种染色方法所不及的。

卡宝品红染色的质量与 HCl 水解时间密切相关。当水解时间不足时, 细胞质也着色, 使反差降低。水解时间过长, 细胞质虽然不着色, 但染色体染色很浅。只有在水解时间适宜时, 才可获得染色的最佳效果, 即染色体呈深红或紫红色, 细胞质无色或只有极浅淡的红色。卡宝品红染色所要求的 HCl 水解温度并不像孚尔根染色法那样严格, 室温、稍加热及 60℃ 水解均可获得同样良好的效果, 只是所需的水解时间长短不同而已。此外, 材料经 HCl 水解后, 务必将 HCl 用水彻底洗净后, 方可染色。否则, 将不易染色。

几种试验材料的解离方法如下表。

试验材料	处 理 方 法
洋 葱	0.1 mol HCl, 60℃, 浸 5~8 min
蚕 豆	先在 45% 冰醋酸中浸泡 2~3 h(室温), 然后在 55℃ 的 45% 冰醋酸保温 15 min
大麦、小麦	先用 0.5% 果胶酶+0.5% 纤维素酶处理 4~5 h, 然后在 0.1 mol HCl, 60℃ 下浸 5 min

卡宝品红染色操作与乙酸洋红或地衣红染色法相同, 可滴染压片, 也可整体预染, 然后用 45% 冰乙酸压片。卡宝品红适用于各类植物染色体染色, 包括真菌、藻类、苔藓、蕨类、裸子植物和被子植物, 均能获得良好的染色效果。在从事植物染色体研究中, 卡宝品红染色可作为优选的常规方法。

5. 苏木精染色压片法

这是一个经典的核和染色体的染色法, 广泛应用于动、植物的显微切片中, 也常用于

染色体研究的染色。主要优点是适用于任何植物的器官和组织,着色力强,细胞核和染色体被染成深蓝色或黑色,细胞质与染色体的反差很好,染色体易于分散。主要缺点是染色操作较繁,需时较长。

苏木精染色具体操作要领如下:

- (1) 固定时间应不少于 12 h。
- (2) HCl 水解时间与卡宝品红染色法相同。
- (3) 务必用蒸馏水将 HCl 彻底洗净。
- (4) 用 4%~6% 的铁矾水溶液中于室温下媒染 2~4 h 或更长时间。
- (5) 换水洗 4~5 次,每次 5 min,直至水溶液不混浊为止,示残留铁矾已洗净。

(6) 在 0.5%~1% 苏木精水溶液中染色 2~4 h 或更长时间。加入苏木精染液后,材料逐渐染成黑色,但苏木精染液仍清澈透明为正确。如染液混浊而颜色呈灰黑色,则示组织中的残留铁矾未洗净。应倾去染液,再加入新的苏木精染液。

(7) 倒掉染色液,用自来水换水浸泡几次,总需时约 30 min,促使苏木精染色充分蓝化。

(8) 材料转入 45% 乙酸中分色和软化,需时 1~6 h 不等,视材料大小或染色深浅不同而变。适时掌握分色和软化恰到好处,是获得优质制片的重要环节。其标准是细胞充分软化而易于压片,而且染色体仍保持较深的染色和硬度,细胞质无色或呈浅灰色,染色体易分散而又不易断裂,这将获得最佳效果。如果压片时材料较硬,染色体深黑易断,细胞质亦呈黑色,表示分色和软化均不足;反之,则示过度,需重新进行媒染和染色。通常,从外观上看,根尖伸长区细胞已变为浅蓝色,分生区仍保持黑色,根已相当软化时为适宜。

(五) 镜检

接通显微镜的电源,打开显微镜光源(注意光源应由小变大,否则影响灯泡寿命)。将染色体制片放在显微镜的载物台上,在 10× 镜下找见具有分裂相的染色体,在 40× 物镜下观察染色体的形态并对其进行计数。

(六) 封片

1. 临时片制作

解剖针在酒精灯上加热,然后接触石蜡,使之融化,随后立即将沾有石蜡的解剖针在盖玻片与载玻片紧贴的四周封以石蜡,但临时片不能放置时间较长。

2. 冷冻揭片法永久制片

(1) 将片子放入干冰、液氮或超低温冰箱中,待其结有冰霜,以利于盖玻片脱落分离。

(2) 用刀片分开载玻片与盖玻片,将载片和盖片同时放入 37℃ 的温箱中烘干。

(3) 取出后在二甲苯中浸泡 10~20 min。

(4) 取出载玻片,滴一滴中性树胶或 Euparal 胶,取盖玻按原样封片。

(5) 贴上标签,注明材料名称、制片者姓名。

3. 乙醇-叔丁醇法永久制片

有人认为叔丁醇法较为简单可靠,不会使材料收缩变硬。但叔丁醇价格昂贵,大量制片很不经济,一般可用正丁醇代之。其方法步骤如下:

(1) 将制片翻转放入盛有 45%醋酸+95%乙醇等量混合液的卧式染色缸或培养皿中,玻片与皿底之间的一边可垫一玻棒,待盖玻片从载片上自由脱落后,过 2~3 min,分别轻轻取出盖玻片与载玻片,将其上的溶液用吸水纸吸去。

(2) 放入盛有 95%乙醇+叔丁醇等量混合液的卧式染色缸或培养皿中 3 min。

(3) 取出后,再放入纯叔丁醇中 3 min。

(4) 取出载玻片、盖玻片,吸去多余溶液,载玻片材料正中滴一滴溶于叔丁醇的加拿大树胶或中性树胶,将盖玻片放回原来的位置上,进行封片。

(5) 贴上标签,注明材料名称、制片者姓名。

注意:在脱水过程中,从上一混合液到下一混合液移动载玻片、盖玻片时,切不可弄错正反面及盖片方向,封片时切忌产生气泡。

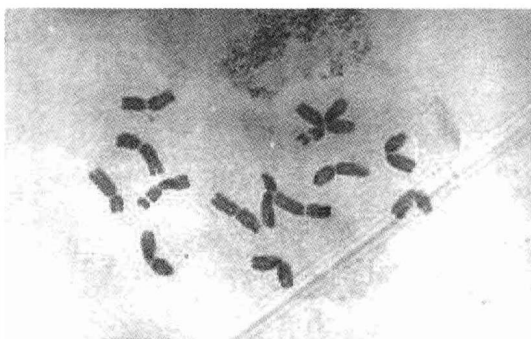


图1 黑麦根尖染色体, $2n=14$

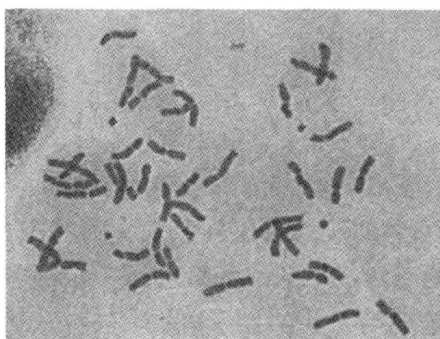


图2 小麦根尖染色体, $2n=42$

六、作业与思考题

(1) 描绘出一张你所做的有丝分裂中期的染色体图片,请注明有多少条染色体。

(2) 根据你的实验情况,总结出制备一张优良的有丝分裂中期染色体制片应注意哪些问题?