

植物细胞学 研究方法

孙敬三 钱迎倩 主编

科学出版社

内 容 简 介

本书介绍了植物细胞生物学中常用的实验方法,内容包括:光学显微镜的制片和细胞化学技术;电子显微镜的制片和细胞化学技术;荧光显微术和显微光度术;染色体制片和分带技术;细胞和原生质体培养技术;细胞组分的分离和纯化技术;凝胶电泳技术和分子杂交技术等。叙述扼要、具体,便于实际操作和初学者掌握。所介绍的各种方法大都经作者亲手验证过,比较可靠。可供植物细胞学、细胞生物学、植物生物工程等方面的实验室工作者和有关大专院校师生参考。

植物细胞学研究方法

孙敬三 钱迎倩 主编

责任编辑 王爱琳

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1987年1月 第一版 开本: 787×1092 1/32

1987年1月第一次印刷 印张: 13 7/8

印数: 0001—3,250 字数: 317,000

统一书号: 13031·3385

本社书号: 5066·13-10

定价: 3.25 元

前 言

植物的一切生命活动，都是以细胞作为基本结构和功能单位进行的。因此，对植物细胞进行研究就成为植物学其他分支学科，如植物分类学、植物生理学、植物遗传学、植物系统演化等研究的重要手段。此外，对于农业科学领域的植物病理学和植物育种学方面的研究，细胞学技术也是被广泛应用的重要方法。经典植物细胞学的研究手段，如石蜡切片、涂片、压片及细胞化学等虽然比较古老，但目前在日常的教学、科研及农业生产实践中，仍然被广为采用，发挥着重要作用。

20世纪50年代以后，电子显微镜技术和核酸、蛋白质等生物化学的研究相结合，发展出分子生物学这门崭新的学科。植物细胞的研究应用了分子生物学研究的新手段，使人们更深入地了解到细胞内各种亚单位的结构、相互关系及核酸、蛋白质等在细胞生命活动中的作用。这些成就为了解植物的各种生命现象，以及进一步利用和改造植物打下了基础。

近年来，生物工程的研究进展迅速，利用“工程”手段改良植物已逐步由理想变成现实。例如，对花粉进行人工培养，改变其正常的发育途径而培育成单倍体植株，已在育种上发挥了作用；植物细胞通过大量培养，已能生产人们需要的某些次生代谢产物；通过原生质体培养和融合也已成功地培育出自然界不存在的新型杂种植株。

由于植物细胞作为研究对象的重要性，不少植物学工作者向中国植物学会植物细胞学专业委员会建议，编写一本比

较全面而又实用的研究植物细胞的工具书。为了满足这一要求，我们聘请了国内在植物细胞学研究上有丰富实践经验的专家分章节撰写了这本书。本书内容比较丰富，基本汇集了经典植物细胞学、植物细胞生物学及植物细胞工程中各种重要的常用的研究方法，可供有关科学工作者实验中随时查阅和参考。

由于编者水平有限，书中疏漏以至错误之处可能不少，敬希读者批评指正。

编 者

1985年6月

目 录

第一章 光学显微镜方法	(1)
第一节 薄切片技术	母锡金(1)
第二节 整体染色法	孙敬三(40)
第三节 胚囊分离技术	周嫦(46)
第二章 电子显微镜方法	(60)
第一节 电子显微镜样品制备的常规技术	孙敬三(60)
第二节 原质体和异核体制片法	钱迎倩(77)
第三节 冷冻蚀刻技术	赵京(85)
第四节 扫描电子显微镜标本制备法	严学成(97)
第五节 超低温扫描电子显微镜技术	黄斌(106)
第六节 染色体的扫描电子显微镜观察	陈瑞阳(108)
第七节 染色体的表面展开法	陈瑞阳(112)
第三章 放射自显影技术	孙敬三(120)
第一节 放射自显影技术的基本原理	(120)
第二节 光学显微镜的放射自显影技术	(123)
第三节 电子显微镜的放射自显影技术	(126)
附录	(130)
第四章 细胞化学方法	简令成(133)
第一节 光学显微镜下的细胞化学技术	(133)
第二节 电子显微镜下的细胞化学技术	(183)

第五章 荧光显微术和显微光度术	(218)
第一节 荧光显微术	杨弘远(218)
第二节 显微光度术	朱澂(248)
第六章 染色体标本的制备和分带技术	陈瑞阳(268)
第一节 染色体标本制备的去壁、低渗法	(268)
第二节 染色体核型分析方法	(283)
第三节 染色体带型分析	(298)
第四节 Giemsa C-带技术	(306)
第五节 Giemsa N-带技术	(314)
第七章 细胞和原生质体培养法	(319)
第一节 细胞的成批培养与固定化连续培养.....	
.....	叶和春(319)
第二节 细胞的微室培养	陆文梁(336)
第三节 单花粉培养	陆文梁(341)
第四节 原生质体的分离和培养.....	
.....	钱迎倩 周云罗(346)
第五节 细胞突变体的诱发和筛选	何卓培(356)
第八章 生物大分子和亚细胞结构的分离	
.....	林忠平(366)
第一节 细胞核和染色质的分离	(367)
第二节 脱氧核糖核酸 (DNA) 的分离	(372)
第三节 信使核糖核酸 (mRNA) 和多聚核糖体	
的分离	(379)
第四节 球蛋白的分离	(386)
第五节 叶绿体的分离	(391)
第六节 线粒体的分离	(393)
第七节 质膜的分离	(396)
第八节 微管蛋白的分离	(400)

第九章 凝胶电泳方法	吴石君(405)
第一节 一般方法	(405)
第二节 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(410)
第三节 等电点聚焦聚丙烯酰胺凝胶电泳	(413)
第四节 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳	(417)
第五节 核酸的琼脂糖凝胶电泳	(422)
第十章 核酸分子杂交技术	吴石君(425)
第一节 原位分子杂交	(425)
第二节 核酸转移及分子杂交技术	(431)

第一章 光学显微镜方法

第一节 薄切片技术

一、引言

薄切片技术是近20年内发展起来的一门新技术，近几年来在植物细胞学、胚胎学、解剖学等研究领域中，已为越来越多的研究工作者使用，颇有代替石蜡切片的趋势。

与历史悠久的石蜡切片技术比较起来，薄切片技术有下列主要优点：①研究材料使用非凝固性固定液固定。②材料包埋采用塑料树脂进行。以上两项技术可以使植物组织、细胞内重要的结构和很多化学成分如蛋白质、核酸、不溶性多糖，以及一些酶活性固定和保存下来，而很少变化。③切片厚度通常为0.3—2微米。染色程序简便，分辨率和清晰度高，可以得到整体组织、细胞的完整形态和较细微结构的真实图象。

另外，在进行超薄切片时，使用薄切片技术可以在光学显微镜下找出包埋块中材料的某一特殊细胞或组织（例如胚珠中的胚囊、卵细胞、反足细胞等），以便于进行超薄切片时判断切割方位，更快地切到所需部分。因此，配合石蜡切片和电镜技术应用薄切片技术，在光学显微镜下进行组织学、细胞学、组织化学的研究是很有发展前途的。

二、材料的固定和固定液配方

固定是一个复杂的化学过程，固定液的组成、浓度、渗透压、温度和材料的大小等因素均影响固定效果。应用于超薄切片的固定液都是非凝固性的固定剂，但是，石蜡切片常用的固定液会使组织和细胞的蛋白质、核酸凝固，从而损坏

了细胞的结构和酶活性，甚至还会溶解掉一些成分。不过也有人由于在野外固定材料时受条件限制，或者仅仅为了观察成熟的机械组织和厚壁的细胞等而进行薄切片时，仍使用石蜡切片常用的固定液，如 FAA、纳瓦兴、卡诺固定液等。

实验用的材料有花药（白头翁）、幼嫩胚珠（白头翁、百合）、胚乳（小麦）、成熟茎、叶（小麦）等。固定材料的大小视其坚实程度和切片刀韧的宽窄而定，通常为 0.2—1 厘米³ 的块。固定液用量为材料的 15—20 倍。还由于植物的器官、组织，例如叶、茎、地下茎等，表面被有厚的角质或蜡质层，内部存在许多胞间隙及高度液泡化（例如胚囊）等特征，阻碍固定液的渗透，因此固定时必须抽气，直到材料完全下沉。下面介绍几种非凝固性固定液的配制及使用方法。

（一）戊二醛固定液

戊二醛（glycolmethacrylate）作为一种固定液是 Sabbittm、Bensch 和 Barrnett 首先采用的，现已被广泛使用。戊二醛的固定作用是由于它能与蛋白质、核酸形成交联，并能保存多种化合物和某些酶的活性。它既可单独使用又可与其他醛类如甲醛、丙烯醛混合使用。

商品戊二醛的浓度为 8%、25%、70% 的水溶液，pH 4—5。由于高浓度、高温、中性或碱性 pH 等因素均导致戊二醛自行聚合，从而失去固定能力，因此戊二醛应盛于棕色瓶内，在低、中等酸度和低温下保存。市售戊二醛含有微量戊二酸及其他杂质，使用前应除去。除去的方法可用活性炭提纯，即向 100 毫升商品戊二醛中加入 10 克活性炭，在 4℃ 下振摇，然后静置 1 小时，过滤，重复上述操作 1—2 次。或取 100 毫升商品戊二醛，加入 2 克活性炭，连续振摇 5—

10分钟，过滤，收集清液备用。

固定液中戊二醛的浓度和配方可参看第二章。根据Juniper的资料，可以由0.5—12%，一般使用1—5%。配制固定液的缓冲溶液除巴比妥-醋酸外，任何缓冲液均可。我们用浓度为25%的戊二醛溶液与0.2M¹⁾磷酸缓冲液或0.1M二甲砷酸钠缓冲液配制含1—5%戊二醛溶液，固定上述各种材料。

配制成的固定液pH为6.8左右，盛于带磨口的细口棕色瓶中，置4℃下保存。使用时如发现沉淀或霉菌生长切勿再用，应重新配制。

固定在室温下进行，以1—3小时为好，如在0—4℃进行，可延长固定时间10—24小时。

(二) 甲醛固定液

甲醛通称福尔马林(formalin)。分子量较戊二醛小，易渗透。固定原理是把细胞内的蛋白质分子互相交联起来。它对一些壁厚的细胞和组织致密的材料具有较好的固定效果。如要在切片上进行组织化学反应，甲醛固定液较戊二醛能更好地保持其酶活性。

商品福尔马林含有37—40%甲醛、10—15%甲醇（作为稳定剂加入的）和少量蚁酸。甲醇和蚁酸的存在影响固定效果，对细胞的细微结构和酶活性有破坏作用，因此用作固定液的甲醛最好是由多聚甲醛(paraformaldehyde)(即通常市售福尔马林中的白色沉淀物)配制，下面介绍甲醛和甲醛与戊二醛两种固定液的配方。

1) M (克分子浓度) 的新单位为mol/l (摩尔/升)，1M $\triangleq$ 1mol/l，下同。

1. 4% 甲醛固定液

称取 2 克多聚甲醛粉末放入 5.0 毫升 0.025 M 磷酸缓冲液中，加热至 60℃，待多聚甲醛完全溶化后，冷却，并将 pH 调节到 6.8—7.5，用 0.025M 磷酸缓冲液将体积调到 50 毫升，配好的固定液 pH 应为 6.8—7.3。固定材料时最好是使用新鲜配制的，因存放时间过久，甲醛将变为甲醇和甲酸而失去其固定能力。

2. 4% 甲醛 + 5% 戊二醛

取 2 克聚甲醛粉末，加水 25 毫升，加热至 60—70℃ 使之溶化（在通风橱内操作），静置冷却（若溶液显浑浊，可加入 1—5 滴 1N¹⁾ NaOH，直至溶液清澈透明）。然后加入 25% 戊二醛 10 毫升，混合均匀，用磷酸缓冲液（0.2M pH 7.4—7.6）或二甲砷酸缓冲液（cacodylate buffer）（0.2M pH 7.4—7.6）调整体积至 50 毫升。1967 年 Karnovsky 对上述固定液做了某些改进，将聚甲醛的用量分别降至 2% 和 2.5%，据说固定效果很好。

（三）丙烯醛固定液

配制 10% 丙烯醛（acrolein）溶液（由 0.025 M 的磷酸缓冲液配成），将 pH 调至 6.8 备用。固定必须在 0℃ 进行，固定时间为 12—16 小时。

Bhanclari 等在研究 *Scilla sibirica* 的胚囊结构及组织

1) 1N（当量浓度） $\triangleq$ (1mol/l) $\times$ 离子价数，下同。

化学时，使用了 10% 的丙烯醛水溶液，在 0℃ 条件下固定 24 小时，然后使用 GMA 混合液包埋，获得良好结果。

(四) 锇酸固定液

2% 锇酸 (OsO_4) 溶液的配制、操作、使用、保存等可参看第二章，在此需要补充说明的是：① 锇酸固定剂是良好的非凝固性固定液，它与各种氨基酸、肽、蛋白质反应，在它们之间形成交联，使蛋白质分子得以固定(图1.1)。

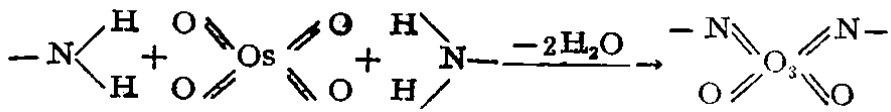


图 1.1 示锇酸与蛋白质反应生成交联化合物

锇酸还能固定不饱和脂肪酸和脂蛋白。② 锇酸固定液是一种强氧化剂，不能与甲醛、戊二醛混合。新配制的锇酸固定液呈中性反应，浅黄色，如果贮存时间太长，或盛器不干净，很易还原形成黑锇（即黑色的 OsO_2 、深棕色 $\text{OsO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Os}(\text{OH})$ 等成分），从而失去固定作用。③ 用锇酸固定的材料应愈小愈好，合适的大小应在 0.25—0.5 毫米³，固定时间为 2 小时左右。

(五) 其他固定液

福尔马林-冰醋酸(FAA)、卡诺(Carnoy)、纳瓦兴(Na-waschin) 等石蜡制片常用的固定液亦可用于制作薄切片的固定液，固定成熟种子、厚壁组织、成熟花药和胚珠，对于观察某些次生结构和某些贮藏物质效果亦很好。

三、脱水与包埋

样品在用包埋剂包埋之前，要彻底进行清洗、渗透，才能做出好的包埋块和切出好片子。根据使用的乙二醇甲基丙烯酸酯和环氧树脂两类包埋介质的不同性质，对样品的清洗、渗透和包埋方法亦不相同，下面分别介绍。

(一) 水溶性树脂

应用水溶性树脂作为包埋剂有多种配方，本章着重介绍用作研究一般结构形态的 GMA 或 GMA-Quetol 523；做组织化学定位的 JB4；做光学显微镜自显影的 GMA-Quetol 523和光学免疫荧光的 Lowicryl K4M 等四种树脂包埋剂的配方和包埋方法

1. GMA包埋法

(1) GMA的包埋机制和配方 乙二醇甲基丙烯酸酯 (glycol methacrylate, 又名 2-Hydroxyethyl methacrylate) 简称 GMA，是一种水溶性包埋树脂，化学结构式如图1.2。GMA 分子中有许多极性基团，能与水和许多其他

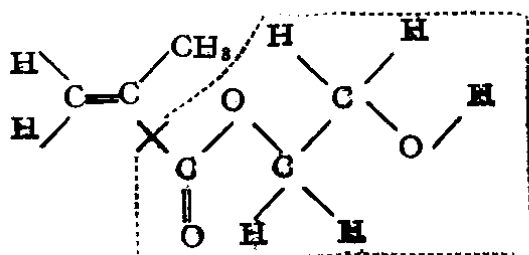


图 1.2 GMA的化学结构 (虚线范围内的结构为图1.5中的R基团)

亲水性的溶剂混合。单体 GMA 为无色、透明、粘性极低的

液体，易渗入植物的各种组织和细胞。如经加热或紫外光照射，即聚合凝固（图 1.3），将细胞内的各种分子包围和支撑起来，而不与材料的分子结合，因此由 GMA 混合液包埋的材料可以保存组织、细胞中很多化合物（例如蛋白质、核酸），而很少变性，与一些非凝固性固定液，例如甲醛、戊二醛等配合使用，可以保持细胞的酶活性，所以由 GMA 制成的切片除主要进行组织、细胞的结构形态学观察，也适合做多种成分的组织化学、酶活性和荧光等内容的试验。

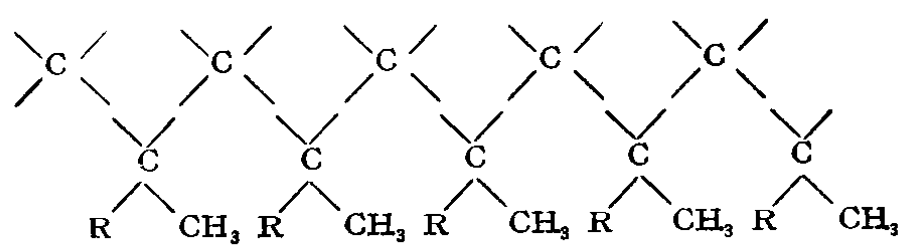


图 1.3 GMA 的聚合结构

目前国内一些实验室用的 GMA 系由 Hartung Associates 或 E. Merck 公司购买的，单体的 pH 为 4.5—6.5，无需提纯即可使用。但一般市售的 GMA 由于出厂时加入了氢醌类防聚合剂（hydroquinone），因此使用前应将其除去。除去的方法是：将 GMA 单体同少量活性炭混合一起，进行振摇、静置或过滤，所得清液保存备用。如果经过提纯的 GMA 中还残存较多的游离甲基丙烯酸，使 GMA 单体的 pH 偏低，致使介质易于碱性染料着色，则使用前应先测量单体的 pH 值。（测定方法：取 0.5 毫升 GMA 单体溶液，加入 50 毫升蒸馏水，混合均匀，而后用 pH 计检查），如果偏低，可用下面任一方法进行纯化。

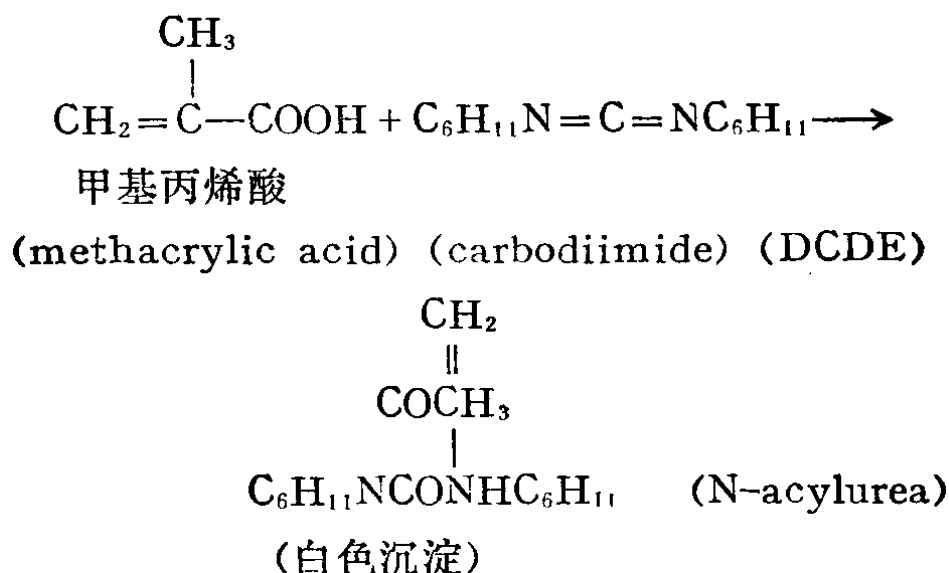
a. Frater 法

（a）取定量 GMA 单体加热至 60℃，以每毫升加入 0.072 克的比例加入 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide（简

称 DCDI), 搅拌混合 1 小时, 待冷却至室温后, 加入 10% (重量 / 体积) 2-butoxyethanol, 搅拌均匀, 置 -10℃ 过夜。其间有许多白色沉淀析出, 次日, 用抽气过滤, 并收集清液。

(b) 向滤液中加入 0.5% *a,a'*-azoisobutyronitrile 加速剂 (或用 1% benzoyl peroxide 亦可), 搅匀, 置 5℃ 下保存备用。

上述方法的化学反应式如下:



b. Tippet O'Brien (1975) 提纯法

(a) 离子交换树脂——Amberlyst A-21 的处理。
将 250 克树脂放入盛 2 升蒸馏水的大烧杯中清洗过滤, 然后加入 0.5 N HCl 搅拌混合, 静置 30 分钟, 以除去树脂中的胺, 并使树脂充分膨胀, 再滤掉 HCl, 用蒸馏水清洗树脂 2-3 次, 用 10% NaOH 溶液, 按上述步骤处理和清洗树脂, 直至清洗液呈现中性 pH 为止。

(b) 将洗成中性的树脂浸泡在无水乙醇内, 过夜, 次日抽气过滤, 除去乙醇, 再将树脂在室温下风干备用。

(c) 除去甲基丙烯酸, 将处理好的干燥树脂分为三

份，分别置于 3 个 1 升的玻璃烧瓶内，取 700 毫升 GMA 原液倒入烧杯 I，搅拌 6 小时，再用布氏漏斗抽滤，依次用 I、II 烧杯中的树脂重复提纯，纯化后的 GMA 约为 200 毫升，损失很多，但纯度高，pH 值一般为 6.8—8 之间。树脂可以回收继续使用。

GMA 包埋剂的配方 使用 GMA 单体作包埋剂还得附加一定量的增塑剂和加速剂，制成混合液，才能得到具有良好凝固和切割性能的树脂块。下面介绍几种 GMA 包埋剂的配方。

配方 1

GMA	93 克
聚乙二醇 400 (polyethylene glycol 400)	7 克
(增塑剂)	
过氧化苯酰 (benzoyl peroxide)	0.6 克
(加速剂)	

配方 2

GMA	90%
2-butoxyethanol	10%
(增塑剂)	
α, α' -azoisobutyronitrile	0.5%
(加速剂)	

配方 3

GMA	95 克
聚乙二醇 400	5 克
(增塑剂)	
2,2'-azobis(2-methylpropionitrile)	
又名(Azobis)	0.4 克
(加速剂)	

将选用的上述任一种配方中的各种成分混在一起，用磁搅拌器搅拌，直到加速剂完全溶解，混溶均匀为止（约需30分钟到1小时）。配好的包埋混合液应盛于细口棕色瓶内，置0—4℃下可保存（保存期可达数年）。调节配方中增塑剂和加速度的用量，可以改变包埋块的硬度。

（2）材料清洗和脱水 在室温下，用0.2M磷酸缓冲液（pH6.8）清洗材料3次，每次15—30分钟，以除去其中的固定液，然后进行脱水。

脱水方式虽有多种，大体都是用各种低级醇，如乙醇、2-甲基乙醇、丙醇、正丁醇或丙酮。为方便起见，只着重介绍常用的乙醇系列脱水法。

用滴管吸去最后一次清洗液，按30%、50%、70%、85%、95%的顺序逐级更换乙醇，每级15—30分钟，100%无水乙醇需更换两次。也可在0—4℃下，在100%无水乙醇中过夜。

（3）渗透与包埋 材料渗透的时间和GMA混合液的浓度，视材料的大小和致密程度而定。材料为0.5—2毫米³大小的，用1/2（GMA混合液+无水乙醇）置换100%无水乙醇，静置或慢速摇动10—12小时，然后用新鲜GMA包埋剂替换，放置24小时后包埋。以上步骤均在0—4℃下进行，如在室温下，可适当缩短渗透时间。材料大小超过2毫米³且结构致密的，则渗透时间要适当延长。

材料包埋最好用药用胶囊，其操作方法如下。取载玻片的硬纸盒作为支架，用打孔器在纸盒的底部或盖上钻若干排孔，孔的直径比胶囊的略小。然后将胶囊插入孔内，胶囊的底部悬空。打开胶囊盖子，用滴管将GMA包埋剂加入胶囊内至3/4的位置。再将纸盒置于装有照明的解剖镜载物盒上，在目镜上观察，整个胶囊都是透明的，再将焦距对准胶