

染色体处理

C. D. 达林顿 著
L. F. 拉 柯

科学出版社

内 容 简 介

本书是关于染色体制片技术的专门书籍,对人类和动植物各种染色体的活体染色;涂片、压片及石蜡切片的制作和染色技术;各种细胞染色体的特殊处理;有丝分裂和受精作用的控制;放射自显影,以及光学显微镜的观察与照相;结果的解释与描述等都作了全面介绍。方法标准可靠。可供细胞学、胚胎学、分类与系统学、遗传学、育种学、病理学等领域的研究与教学人员使用及参考。

C. D. Darlington L. F. La Cour
The Handling of Chromosomes
George Allen & Unwin, 1976, 6th ed.

染 色 体 处 理

C. D. 达林顿 L. F. 拉 柯 著

姚璧君 简令成 钱迎倩 译

朱 激 校

责任编辑 姜梦兰

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

*

1982年9月第 一 版 开本:787×1092 1/32

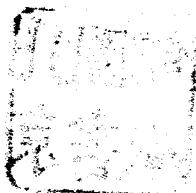
1982年9月第一次印刷 印张:8 1/8

印数:0001—7,300 字数:183,000

统一书号:13031·1989

本社书号:2706·13—10

定 价: 1.30 元



第 六 版 前 言

染色体支配遗传和变异，并控制发育。所以研究它们对于生命科学各部分的教学与研究都成为十分必要的了。本书就是打算阐明我们如何为这样的目的而去处理它们的。方法包括从最简单的处理到最精细的操作。为把近六年来，特别在哺乳动物染色体的研究，以及不论用吉姆萨分带还是奎吡因荧光去揭示异染色质的方法等方面的进展都反映出来，本版作了全面的修订，把上一版中所有的程序表、一览表和分类都添加了最新的资料。有两幅新图版。文献目录也大大地扩充了。

C. D. 达林顿

L. F. 拉 柯

• • •

目 录

第六版前言.....	v
第一章 染色体工作的由来、范围和目的	1
第二章 设备.....	5
一、显微镜.....	5
二、分辨率和放大倍数.....	6
三、光照和滤光器.....	8
四、油和透镜.....	10
五、描绘器.....	11
六、其它设备.....	11
第三章 活的染色体.....	12
一、材料.....	12
二、方法.....	13
三、活体染色.....	13
四、染色体的光学.....	14
第四章 大体积固定.....	16
一、原理.....	16
二、应用.....	17
三、媒染和水解.....	19
四、穿透.....	19
五、材料的条件.....	20
六、持续时间.....	21
七、大体积固定的用途.....	21
第五章 涂片和压片.....	22
一、材料.....	22

二、涂片方法	22
三、醋酸压片法	22
四、离析	25
第六章 石蜡法	28
一、意义	28
二、固定和冲洗	28
三、脱水和浸蜡	28
四、包埋	29
五、切片	30
六、蜡带贴片	31
七、脱蜡	32
第七章 染色和封片	33
一、染色	33
二、封片	36
三、褪色	37
四、再染色	38
五、漂白	38
第八章 特殊处理	39
一、预处理	39
二、显微化学试验	41
三、动物卵	46
四、唾液腺	47
五、蝌蚪尾巴	49
六、两栖类的精巢	49
七、灯刷染色体	49
八、大蚊的精巢	50
九、血液	51
十、哺乳动物胚胎	52
十一、肿瘤	52
十二、体细胞组织内性别的鉴定	53

十三、中期染色体中的吉姆萨分带.....	54
十四、用荧光染料对异染色质的识别.....	55
十五、用分染法鉴定姊妹染色单体.....	56
十六、不同类染色体 DNA 的原位定位与鉴定	57
十七、胚囊和胚乳.....	58
十八、减数分裂前的有丝分裂.....	59
十九、粗线期.....	59
第九章 有丝分裂的控制.....	61
一、辐射.....	61
二、化学作用.....	72
三、差别反应.....	75
四、温度.....	77
五、离心法.....	78
六、各种遗传学措施.....	78
第十章 受精的控制.....	80
一、花粉萌发.....	80
二、花粉管的分裂.....	81
三、花粉贮藏.....	82
四、花柱.....	83
五、单倍体植物.....	84
六、单倍体动物.....	85
第十一章 照相术.....	86
一、应用.....	86
二、照相机.....	86
三、照相.....	87
四、显影.....	88
五、印相与反差的调节.....	88
六、复制用的照片准备.....	89
七、荧光屏投影.....	90
第十二章 放射自显影术.....	91

一、应用	91
二、方法	91
三、组织的制备	92
四、放射自显影的曝光	94
五、获得放射自显影所必需的示踪元素的量	94
六、本底和膺象	95
七、放射自显影象的观察	96
八、除去放射自显影象	97
第十三章 观察结果的描述	99
一、解释	99
二、插图	100
三、描述	101
图版	103
附录 I 材料来源	134
附录 II 标准溶液	146
附录 III 处理的程序表	159
附录 IV 工具目录	194
附录 V 缩写	199
附录 VI 术语汇编	201
参考文献	216

第一章 染色体工作的由来、 范围和目的

1831年 Robert Brown 发现并命名了细胞核。他看出了它的重要，但他并不知道它行使什么功能和怎样工作。当时他不能理解它在细胞和有机体中，甚至在整个生命表现中所起的作用。自那以后我们了解这些事物，我们的认识可以概括为一句话：细胞核就是染色体。在细胞核中总管细胞的机构是静止的，而在染色体中它却是在运动的。

然而这是染色体本身被命名以前 50 年的事了，细胞核的研究起始于对整个有机体、组织和细胞的研究。它的方法和观念最初是从它大量的原始工作中发展起来的。在植物学、动物学和医学之间，对它的教学内容的细分仍然使人想起它的突然诞生。解剖学家则根据长期来的习惯仍赋予它们和它们的大小相应的价值(如他所认为的)。如 Robert Brown 所说的：“我在植物学家的著作中，迄今所遇到的这种细胞核或小空隙存在的一点证据，主要是在表皮的一些图片中……然而它看来是如此不重要，以致在表示它的图的说明中也不是经常提到它的出现。”(1833)

然而，现在已不大有忽视细胞核的危险，对染色体的研究已成为一门独立的学科，即有它本身的理论和技术的一门学科。染色体既是其化学被探讨的最大的分子，也是其运动和变化能看得见并能追踪的最小的活结构。在整个活机体中，染色体表现出在化学和结构上的一致性，我们现在知道，这就是它们在生理学和遗传学中一致性的基础。

在轮藻的单丝状体和鸭趾草雄蕊毛的细胞中有丝分裂的相似性，在涡虫精巢和牡丹花药中的减数分裂的相似性，以及在玉米和果蝇中的核酸周期及其奇异行为的相似性——这些事物可能还要使我们惊奇。然而现在我们也已学会利用它们。它们表明，在寻找实验或示范材料时，我们可以从一种材料转向另一种材料，而且当我们这样做时，我们只须考虑自己在技术上的便利。百合能告诉我们在小鼠中发生的事。苍蝇可以告诉我们在人体中发生的现象，虽然必要时在某些情况下，人的染色体在更经常地根据他们自身的情况进行研究。我们能够用随便哪种最大的、最容易的、最熟悉的或者最合适的材料；或只是因为它适时而被采用。

在染色体研究中的这种统一性，来自它们化学特性的一致性。所有染色体都是核蛋白大分子，在其结构中具有非常一致而可以确定的成分。这种成分是 DNA，或叫去氧核糖核酸。在一切有机体的所有染色体中，我们相信，它总是由仅仅排列成不同的顺序和比例的相同的四种碱基或核苷酸所组成的。第二种成分是蛋白质，它不是限定得很准的；而第三种成分 RNA 或核糖核酸，至少是由三类不同的物质所组成，它们作为初级基因产物在 DNA 上形成，并和细胞中的大多数蛋白质合成密切相关。

所以我们研究染色体有三个目的：

第一，我们必须把染色体作为化学结构来观察，这种结构在细胞范围内显示它们自己所特有的行为的规律，而且是细胞和有机体繁殖的基础。

第二，我们必须把染色体作为细胞生命的控制器官来加以观察。就是说，这种控制器官的变化成为动物和植物发育的变异性或稳定性，健康或生病的基础。就是这种功能使它们的控制作用成了肿瘤研究的事情。

第三,我们必须把染色体作为基因链,遗传性负荷者来研究。因为它们一致的运动表达了这种基因链的法则。就是这种功能使它们的控制作用成为动物和植物育种实践所必需。

因此,在这些初步的目的后面有一个最终的目的,即从生殖、遗传和发育三方面来控制生命。正像我们将会明了的,这种控制必须经由四种过程,通过染色体的作用来实现:(1)有丝分裂和基因的繁殖;(2)减数分裂和它们的重组;(3)受精作用和多倍性;(4)基因群的突变作用、断裂和再结合。要掌握这种能力,我们就必须知道染色体生命的所有阶段,并在被选作最适合研究的有机体中,即再一次为了它们技术上的方便而选中的有机体中去熟悉它们。

这些年来,染色体的处理无论是在固定和染色方面,还是在粗略的处理和精细的光学方面都有了很大进展。果蝇的历史是并行连续发展的极好而特殊的例子。在这种人们喜爱的实验材料——果蝇上应用的育种、染色体计数、X射线、唾液腺、移殖,这些手段和设计都扩大了实验的基础,从而终于把遗传学和细胞学结合成一种实践和一种学说。

这种结合将在人类社会对于防止疾病,以及对有害基因从一代传到下一代的可能有的调节起越来越大的作用,对于人类染色体的连锁研究和作图的前途确有很大的影响,现在由于新引入的显带技术而使它成为容易做到的事了。

许多有效的染色体方法也是极其简单的。其它方法则如你所希望的那样精细。学生、老师和研究工作者现在不能从单一来源去掌握为他们所需要的资料,而许多所需要的资料又尚未发表。试剂、技术、有机体和问题都紧紧结合在一起,它们的相互适合程度,必须按照我们现在所掌握的知识来安排。

然而经验表明,技术的出现有两个时期。第一,研究能够

应用于所有有机体一般性质的技术；第二，研究为我们用于特殊有机体、组织和发育阶段，以及对于特殊目的工作所必需的技术。例如，我们在染色体中有各种结构：着丝粒、核仁组织者、异染色质和交叉。细胞核有的处于有壁的或无壁的细胞中，有的处于分裂的细胞中，以及有的处在各种分化的细胞中。

为了改变发育或进化的过程，我们有许多实验处理。所有这些第二步的需要都对初步的技术产生影响，即在每种情况中都要求我们有正确的方法。现在我们将对完全为人们所需要的那些简单方法加以描述，并且指出专家们如何、为何以及何时需要对它们进行推敲和提高。

第二章 设 备

一、显 微 镜

作染色体工作的标准显微镜必须包括以下的组成部分。

- (1) 两个全消色差的物镜：(i) 16 mm 干的和 (ii) 2 mm 或 1.5 mm 的油镜。(参见表 1)
- (2) 一个在载物台下的聚光器。
- (3) 一个平面镜或三棱镜。
- (4) 放大约 5 倍、15 倍和 30 倍的三个目镜。
- (5) 一个机械载物台。
- (6) 一个显微描绘器。

然而除最精确的工作外，所有的观察都可以用消色差物镜代替全消色差物镜。

此外，对于大多数工作者说，一个 8 mm 的物镜和 10—20 个目镜是有用的，而且对某些人来说是不可缺的。为了摄影工作，一个转动的载物台对于调整与视野有关的底片方向是很方便的。

如果经常绘图和照相，用双管目镜对于准确的观察与单筒的目镜相比，是没有价值的，它会使光照损失而且又浪费很多时间。它的好处像是使工作者可以进行常规的观察，对于采用现代技术能达到的大多数目的来说，现在已成为多余的了。

对于特殊目的则需要其它三种显微镜。

- (1) 为了决定用吡啶衍生物产生荧光的染色体位置需要一个荧光显微镜，它最好配有最大口径的油浸物镜，并装配一

个排气超高压汞灯和适宜的滤光片。

(2) 为了观察和调节染色后分色,需要一架低倍显微镜。聚光器由凹面镜代替,并具有 8 mm 和 16 mm 的接物镜,不需要全消色差的。日光可用作光照。

(3) 为了解剖胚囊、精巢和唾液腺以及其它特殊组织,需一架 Greenough 双管显微镜。一个乳白电灯用作光照。

二、分辨率和放大倍数

显微镜的分辨率是它对一个目的物的各部分的影像分得清的能力,这是由各部分相隔的距离来测定的。分辨率决定于照射目的物的光和通过物镜的光锥角。另一方面,放大倍数在于和目的物所对的角度相应的眼睛中的影像所对的角度放大。由物镜、管的长度和目镜(除分辨率外)所形成的放大倍数,为观察者的眼睛去详细地分辨和记录目的物提供足够大的影像是必需的。用最高倍目镜作为提高分辨力的手段是没有意义的,除非用一种提供适宜的分辨力的系统,最高倍的目镜是浪费的。相对于其它条件而言,过分的放大或过高的分辨力可以说都是无用的。

观察者的眼睛有两个方面没有被显微镜检术的学说注意到。第一,观察者的分辨能力不同。对于某个人而言是无意义的放大,可能对于另一个人却是必需的。第二,眼睛的分辨力随光的不同波长而异。Coles (1921) 说,虽然显微镜分辨得最好的光是蓝光,但眼睛分辨得最好的是绿光。

但是可以证明,眼睛对白光的分辨力是最大的,因为当时所有的光锥(红、绿和蓝)都可起作用。

最大的分辨力可以从几个方面得到:(1) 临界照度;(2) 一个数值孔径为 1.4 的油浸消色差聚光镜;(3) 一个同样数值

表 1 复消色差物镜的大致能力 (只用补偿目镜)

焦距长度	数值孔径 (<i>n.a.</i>)	160mm 管长下的放大 $m = \frac{t.l.}{f}$	分辨极限* $h = \frac{0.61\lambda}{n.a.}$	焦距深度+ <i>df</i>	物体-物镜距离++
干					
	$\frac{2''}{3} - 16\text{mm}$	10	1.51 μm	12.2 μm	8.0mm
	$\frac{1}{6} - 4\text{mm}$	40	0.50 μm	1.3 μm	0.7mm
油	$\frac{1''}{8} - 3\text{mm}$	53	0.44 μm	1.0 μm	0.47mm
	$\frac{1''}{8} - 2\text{mm}$	80	0.29 μm	0.4 μm	0.37mm
	$\frac{1''}{8} - 2\text{mm}$	80	0.27 μm	0.4 μm	0.22mm
	$\frac{1''}{8} - 1.5\text{mm}$	107	0.29 μm	0.4 μm	0.25mm

(*) 按绿光计算, $\lambda = 0.54\mu\text{m}$ 。
 (+) 在折射指数 1.5 的介质中 (Martin and Johnson 1931)。
 (++) 减去约 0.17mm, 求出盖玻片以上的“工作距离”。
 [注] 盖玻片的厚度如下: No. 0 75—100 μm ; No. 1 100—167 μm No. 2 167—215 μm 。

孔径的油浸全消色差物镜。这两件中只要任何一件的数值孔径是低的，必然限制有效光锥，因而也就限制整个系统的分辨率。

显微镜检术的最大的价值是把显微镜作为一件理想的光学器械，然而它可能被当作一件有两级光学效应的仪器。低倍放大对常规观察、基础教育、甚至对于远远不到显微镜分辨极限的大染色体的研究就已够用。对较小体积的观察以及为了照相，较高倍的放大是需要的。为第二种情况所必需的谨慎，如果用在第一种情况，则就是令人厌烦和多余的了。

对于大多数常规的研究，分辨力达 $0.37\mu\text{m}$ 就足够了，没有必要低到 $0.27\mu\text{m}$ 。由于在聚光器上的油总是麻烦的，可以用干聚光器。这样聚光器自动地限制其数值孔径到 1.0。具有 1.3 数值孔径的物镜的整个系统将有 1.15 有效的数值孔径（参看 Coles 1921, Chamot and Mason 1938），而分辨的极限约是 $0.33\mu\text{m}$ 。如果完全无意地用油，那么一个孔径为 1.2 的消球差的聚光器就足够。作为严格和贪图方便之间的折衷，用任何聚光器时都可用水代替油。（Belling 1930）

三、光照和滤光器

在用于染色体工作的显微镜效应中，实际上限制因子一般不是显微镜而是光照系统。对于低倍的光照最简单的方法是用亮天的日光，以平面镜和集光器把在载玻片上物体平面上的光线集中在镜筒的光轴上。用这种方法产生的光照强度当然是不能控制的，它的光源是散射的。产生一下子就是精确的、恒定的而不散射的，并且聚焦在物体上的光源的影像，这是人工光照能做的事，这样可以构成临界照射。光源必需小而均匀。如果显出任何结构，聚光器必须离开焦点，使分

辨力稍微减低。它的照射必须用凸透镜聚集成几乎平行的光线,充满整个载物台下的聚光镜。

在荧光显微镜检术中需要两个滤光系统。在光源和标本之间需要一个初级的或者“激发器”滤光器,以排除所需波长以外其它所有的光,来促进所用的荧光染料的荧光发射。而第二个或“阻挡”滤光器必须插在标本和眼睛之间,一般是在目镜内,这样就保证只有从发荧光的标本来的光达到眼睛。选择正确组合的滤光器决定于所用的荧光染料和光源的分光特性。激发滤光器 4 mm BG-38 或 1.5 mm BG-12, 用于和 K-530nm 栅栏滤光器,以及 HB-200 水银灯的光源相组合,适合于荧光染料、奎吖因芥子气或它的二氢氯化物。

如果光照强度不能在光源处调正,可以用下面四种方法中任何一种去降低它。

- (1) 缩小光源的光圈。
- (2) 缩小载物台下的隔光圈。
- (3) 放下载物台下的聚光器使隔开焦点。
- (4) 在载物台下或在光前加有色滤光片。

对于高倍镜,用第一种方法足以降低到临界光照所要求的最低的光照。第二种方法削减光锥,这样就降低目镜的分辨力。第三种方法只推荐给染色较淡或褪色的制片,用低倍的目镜作常规观察用。利用细胞壁和染色体的区分折射率来产生效应以显示出它们,这是一种机动的暗背景光照。

最后一种方法对于精细的工作是最有用的。对于观察工作来说,滤光片的选择可从两方面考虑,即光的颜色和染料的颜色。一般淡的滤光片应能在光下校正任何颜色。强的滤光片必须和染料互补: 蓝的滤光片用于品红和洋红,黄绿色滤光片用于结晶紫(如 Wratten 滤光片 58 在 5200 Å 具有最大的透射力)。仅仅为了降低光强度的效果可以用中性灰色滤光

片得到。滤光片用毛玻璃代替所损失的临界光照，对于常规目的是允许的。

通常用一块平面玻璃镜反射光束到显微镜光轴。这样一个镜子产生轻微的光源的次级影像。为了避免这些，可以用一个镀铝的镜或三棱镜来反射。

四、油和透镜

浸镜油必须尽可能地接近冕玻璃，即 1.518 的折射率（参阅 Mounting Media 第七章）。过去为了这种理由曾用香柏油，但是它容易风干，需要用二甲苯湿润的擦镜纸去擦干净。现在可以用一种和 α -溴代萘 ($n = 1.660$) 混合的不干的矿物油或植物油，其组分如下：

(i) 液体石蜡 75.1%； α -溴代萘 24.9%。

(ii) 橄榄油 75.9%； α -溴代萘 24.1%。

由于折射率可随时间而变化，其比例可以用折射计测定而加以校正。专用的油必须用同样方法测定。

这些非干性油可不必用二甲苯，也不必在透镜的表面上直接加压力即可去掉。只要用指尖*压锥形的镜头，透镜就会擦得非常干净。这是很重要的，因为保证擦镜纸完全没有灰砂而最能安全的保存是不可能的。萤光显微镜必须用一种非萤光浸镜油。

干透镜必须用骆驼毛刷去灰，用二甲苯洗净。为此，目镜和干物镜可以取下来。油镜必须只能由熟练的人取下。

* 带擦镜纸。——译者注