

ZHIWUXIBAO YICHUANXUE DE YANJIU FANGFA YU JISHU

植物细胞遗传学的 研究方法与技术

李子先 刘东旭 编著



ZHIWUXIBAO YICHUANXUE DE
YANJIU FANGFA YU JISHU

四川科学技术出版社

内 容 提 要

本书主要介绍植物染色体现代制片技术、显带技术、染色体工程技术和基因定位技术,以及这些技术在具体的植物遗传学研究中的应用,它集国内外最新实验技术与方法之大成,反映了当前植物细胞遗传学研究技术与方法的新水平。全书把试验设计、基本原理与实验技术融合在一起,突出技术与方法,有很强的实用价值,是一部好的工具书。可供高等院校生物系,农学系以及科研部门的生物科学和农业科学工作者参考。

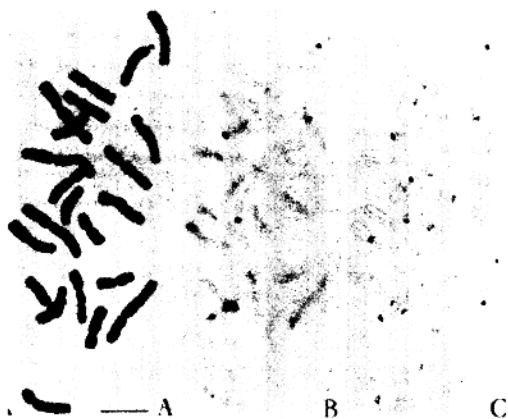


图 2-1
A. *Hemerocallis dumortierii* 根尖细胞经醋酸洋红染色后的中期染色体图。B. 显示 C-带。C. 显示图 A 和图 B 中染色体的形态。浓黑处示强染色 C-带，而状示弱染色 C-带。图标尺为 $5\mu\text{m}$ 。

图 2-2
“中国春”的 C-带核型图。阿拉伯数字 1~7 表示小麦染色体部分同源群；A、B、D 代表小麦染色体组。由于这些染色体取自不同的细胞，因此，它们在图中的大小不一定代表它们在细胞中的相对大小。水平线指示着丝粒所在位置。图标尺为 $10\mu\text{m}$ 。

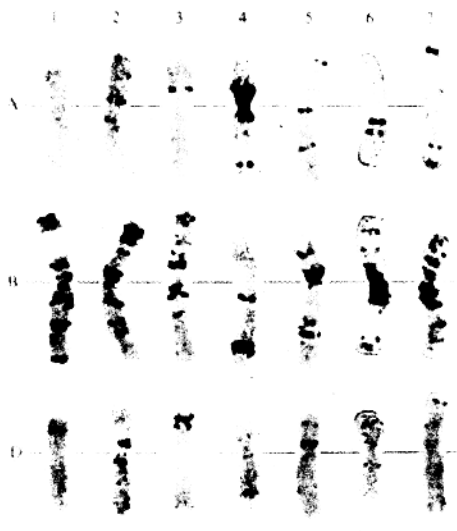




图2-3 *Vicia hajastana* 染色体 G-显带, c. 中期细胞 G-带图。
d. 中期细胞, 显示染色体的点状 G-带, 箭头指示 G-带带型相
匹配的染色体对。



图2-4 「中国香」体细胞中期染色体图。F₂Z₁-显带
前。a. 同一细胞之1-显带后。箭头指示 G₂ 染色体长臂上
的三级缢痕。图标尺为 10μm。

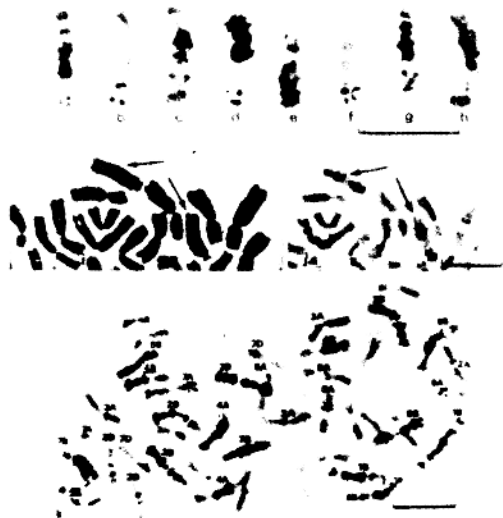


图2-5 小麦代换系中发现的染色体畸变。a. "Cheyenne" 4B 代换系中与它的6B 相类似的染色体。b. "Cheyenne" 7D 代换系中饰变的7A 染色体。c. "Hope" 6B 代换系中饰变的7B 染色体。d. "Hope" 3D 代换系中饰变的等臂染色体6BL(?)。e. "Hope" 3D 代换系中饰变的端着丝粒染色体6BS(?)。f. "Hope" 3D 代换系中饰变的6A 染色体。g. "Hope" 7D 代换系中饰变的7B 染色体。h. "Timstein" 5D 代换系中与它的4A 相类似的染色体。i. "Hope" 7D 代换系中在N-显带前饰变的5B 染色体(箭头)。j. "Hope" 7D 代换系中在N-显带后饰变的5B 染色体(箭头)。k. "Hope" 1D 代换系中发现的染色体4B 三体细胞。图指标尺为10μm。



图2-6 *A. sativa* 染色体中期分裂相, 显示亚中部着丝粒染色体对的NOR 银染色。



图2-7 *L. culmaris* 染色体中期分裂相, 显示随体染色体的NOR 银染色。

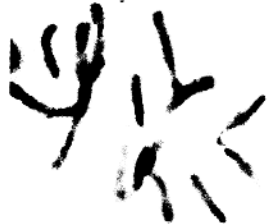


图 2-8 *V. faba* 染色体中期分裂相, 显示中部着丝粒染色体对的 NOR 银染色, 注意 NOR 的形态差异。

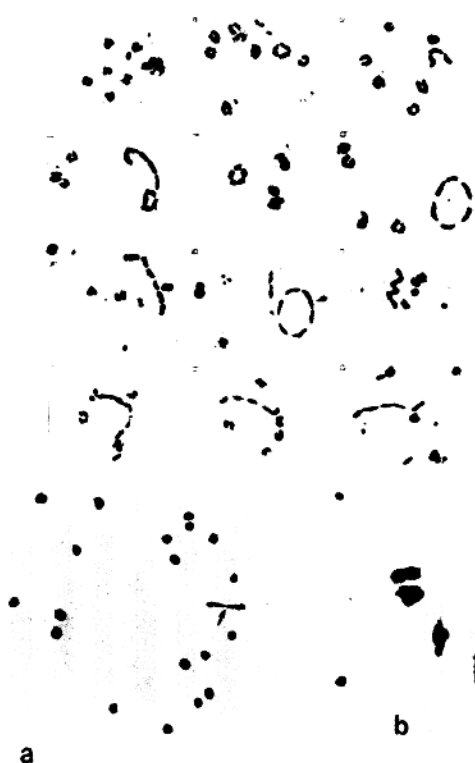


图 3-2 珍珠稗不同三体 ($2n+1$) 类别终变期和中期 I 染色体图。a. 1Ⅲ(链)+6Ⅲ b. 1Ⅵ(环)+1Ⅲ(炸锅状, 包含核仁染色体)+3Ⅲ c. 1Ⅵ(之字链状)+4Ⅲ+1Ⅰ+1B d. 1Ⅴ(链)+1Ⅲ(炸锅状)+3Ⅲ+1Ⅰ+2B e. 1Ⅲ(环)+6Ⅲ+4B f. 1Ⅴ(环)+4Ⅲ(一个非核仁二价体消失) g. 1Ⅵ(环, 箭头示小等臂染色体)+4Ⅲ+4B h. 1Ⅴ(链)+5Ⅲ i. 7Ⅲ(全部为末端交叉的环)+1Ⅰ j. 1Ⅴ(链)+5Ⅲ k. 1Ⅵ(炸锅状)+4Ⅲ+4B l. 1ⅠX(叉状链)+3Ⅲ(ⅠX链和一个环二价体相连) 图标尺为 $10\mu\text{m}$ 。

图 3-4 中期 I 染色体图:
a. 杂种 F_1 花粉母细胞, 显示 $22\text{I}+1\text{II}$ (箭头)
b. MAAL 花粉母细胞, 显示 $12\text{II}+1\text{I}$ 。

前 言

本书介绍的植物染色体现代制片技术、显带技术、染色体工程技术和基因定位技术等内容,目前都正在不断发展中。其中联合显带技术、银染技术十分诱人,在细胞遗传学研究上很有用处。染色体工程技术与其它生物技术相结合已显示出辉煌的前景。基因定位技术中的 RFLP 技术,在解决数量性状的遗传与基因定位方面是一个新的里程碑,已引起遗传学家和育种学家的极大兴趣。

本书提供的重要参考文献,将帮助读者了解更多更深的东西。但由于作者见识不多,难免有谬误之处,敬请同行指正。

编 者

1990. 12. 于中国科学院成都生物研究所

目 录

第一章	植物染色体制片技术	(1)
第一节	概 况	(1)
第二节	各类制片技术分述	(1)
第二章	植物染色体显带技术	(25)
第一节	植物染色体 C—带	(26)
第二节	植物染色体 G—带	(45)
第三节	植物染色体 N—带	(67)
第四节	植物染色体银染	(88)
第三章	植物染色体遗传工程技术	(109)
第一节	进展和展望	(109)
第二节	技术与方法(重点技术摘要)	(117)
第四章	植物染色体基因定位技术	(152)
第一节	概 述	(152)
第二节	遗传图构成原理和方法	(154)
第三节	基因现代定位技术	(178)

第一章 植物染色体制片技术

第一节 概 况

制片技术从大的范围讲有两种技术,一是经典的压片技术,又称常规压片技术,其特点是将细胞或组织先经固定和染色后再进行压片。这一技术的发展历史已逾半个多世纪,用这一技术奠定了植物细胞遗传学和细胞分类学的基础,迄今在植物染色体研究领域仍很有用。我国对这一技术作出重要贡献的是著名实验植物学家李懋学先生。他得心应手地将其用于大量的植物细胞遗传学和细胞分类学的研究,解决了未曾解决的一些植物的起源演化和准确的核型问题。另一个是近代制片技术,这一技术的要点是酶解去壁、低渗和火焰干燥,特点是染色体分散好,背景干净,染色体形态不受外力影响。这一技术是与染色体显带技术应运而生的。先行者是 Gill, B. S. 等(1974), Kurata, N. 等(1978)。我国在这方面作出积极贡献的有陈瑞阳、田自强、朱凤绥等专家。新的制片技术对于发展染色体显带是重要的,尤其是对高分辨 G-带是必需的。

第二节 各类制片技术分述

本节主要介绍现代制片技术。为了完整性,以下按取样种

类,研究目的分述。

一、以根尖叶芽和居间分生组织等为材料的体细胞分析

1. 取样

根分为根冠、分生区和伸长区等几部分。分生区长约1~2mm,细胞多为等直径的细胞,细胞质浓厚,细胞核较大,可占整个细胞体积约3/4。这些细胞能不断地进行细胞分裂,因此,分生区是我们观察染色体的取用部分。

叶芽包括幼叶、叶原基、生长锥和腋芽原基以及正在分蘖和拔节的心叶等各部分。居间分生组织包括有分裂活动的节间基部,叶鞘的基部,长度约2~5mm。

2. 制片技术

主要介绍以下三位实验植物学家的技术流程:

(1)N. Kurata 等(1978)技术程序。以水稻为材料

①种子在25~30℃下发芽。

②切下根,放在0.002M 8-羟基喹啉溶液中,18~20℃,预处理2~3小时。

③切下分生区(约1mm),浸入0.075M KCl中,室温处理20分钟。

④将材料放入6%纤维素酶和6%果胶酶(用HCl调pH至4.0)混合酶液中,35℃处理1小时,以去除细胞壁。

⑤将离析的分生组织材料放进蒸馏水中,20℃,处理5~10分钟,以洗去酶液。

⑥夹取一块分生组织放在清洁载玻片上,滴上一滴新鲜固定液(3:1乙醇:冰醋酸),用解剖针涂片,再加上几滴固定液,片子在火焰上干燥。

⑦用相差显微镜观察,选取展开得好的细胞制片,用

33mM Sørensen 磷酸缓冲液(pH6.8)将 Giemsa 稀释 30 倍后染色。接着用蒸馏水冲洗,并风干。

⑧对分辨好的细胞照相,并作核型分析。

(2)田自强、朱凤绥(1980)技术程序

他们对 40 个属的 50 个种的种子植物,其中被子植物 48 种,裸子植物 2 种,包括粮食、油料、纤维、蔬菜、薯类、果树、牧草、茶树等作了实验。样品采自根尖、幼穗、小叶、愈伤组织等。实验步骤主要参照 N. Kurata 等在水稻上成功的方法。以根尖处理为例,如下:

①种子萌发 在 25~30℃下发芽,根长 1~2cm 时切取根尖。

②预处理 切根置于 0.002M 8-羟基喹啉中,不超过 18℃处理 3 小时(夏天可用冰块降温),蒸馏水洗净。

③前低渗 移入 0.075M KCl 中,18~28℃处理 20 分钟,蒸馏水洗净。

④酶解去壁 移入 2.5%纤维素酶和 2.5%果胶酶中,酶溶液用 HCl 或 NaOH 调整 pH 为 5.0~5.5,18~28℃酶解 3 小时,蒸馏水洗净(沿容器壁放入蒸馏水,切忌冲坏分生组织)。

⑤后低渗 移入 18~28℃蒸馏水中低渗处理 20 分钟。

⑥火焰制片 切取 1mm 左右根尖分生组织置于清洁载玻片上,加一滴新鲜的甲醇:醋酸(3:1)固定液(放固定液后可在冰箱内停放一周),用镊柄充分捣碎以后,再滴少量固定液,在酒精灯上火焰干燥,使细胞分散、展开,完成制片。

⑦染色 用 Sørensen 磷酸缓冲液调整 pH 值至 6.8,配制 10:1 的 Giemsa 染液,染色 30~90 分钟,用蒸馏水冲净,风

干。

⑧封片(也可不封片),镜检。

(3)陈瑞阳等(1982)技术程序

他们对 37 科 105 种植物(包括 372 个品种),其中蕨类植物 2 种,裸子植物 4 种,被子植物 99 种,进行了试验。使植物染色体去壁低渗、火焰干燥制片法基本完善。实验步骤如下:

①材料培养 种子在恒温条件下发芽培养,待根长至 0.5~1cm 时进行预处理。

②预处理 在有丝分裂高峰前 2~3 小时用 0.001~0.2%秋水仙素或 0.002M 8-羟基喹啉或对二氯苯饱和溶液进行预处理。

③前低渗 切取根尖上分裂旺盛的部分,放在 0.075M KCl 低渗液中,在 20~25℃条件下处理 30 分钟。

④去壁 移去 KCl 溶液,加入 2.5%混合酶液(纤维素酶与果胶酶各占 2.5%) 在 25~30℃温度下处理 2~5 小时,在处理过程中,最好将材料瓶轻轻摇动数次,促使酶反应充分。酶液的量与材料要有一定的比例,100 条小麦根尖(只切取分生区)加入 1ml 酶液为宜。

⑤后低渗 移去酶液,用 20~25℃蒸馏水慢慢冲洗 2~3 次,然后在蒸馏水中停留 5~10 分钟,进行后低渗处理。后低渗以后,可以有三种方法制备染色体标本:

第一种方法 先制备悬液再固定

1)制备细胞悬液 移去蒸馏水,用镊子立即将细胞夹碎,制成细胞悬液。

2)固定 向细胞悬液中加入新配制的甲醇:冰醋酸(3:1)固定液 4~5ml。

3)去沉淀 静止片刻,使大块组织沉淀,然后吸取上层细胞悬浮液,弃掉沉淀物。

4)弃上清液 将上层细胞悬浮液静止 20~30 分钟,已见细胞沉淀时,用吸管吸去上层清液,留约 1ml 细胞悬浮液制备标本。

5)标本制备 取一张预先在蒸馏水中冷冻的清洁载片,用滴管滴 2~3 滴细胞悬浮液在其上面,立即将载片一端抬起,并轻轻吹气,使细胞迅速分散。然后在酒精灯火焰上微微加热烘干。

6)染色 干燥的片子以 40 : 1 Giemsa 染液(用 pH7.2 1/15M 磷酸缓冲液稀释)染色 4~30 分钟,蒸馏水冲洗,空气干燥后,用 Damer 树胶封片。

第二种方法 先固定后制备悬液

1)固定 将后低渗的材料,先经甲醇:冰醋酸(3:1)固定液固定。

2)制备细胞悬液 材料于固定液中用镊子夹碎,制备细胞悬液。

3)弃沉淀 以后过程与第一种方法相同。

第三种方法 涂片法

1)固定 同第二种方法。

2)涂片 将去壁固定的根尖,放在清洁的载片上,加一滴固定液,然后用镊子将材料夹碎,去掉大块残渣。

3)火焰干燥 将载片在酒精灯上微微加热烘干。

4)染色 同第一种方法。

二、减数分裂分析

1. 取样

取样标准因植物而异,多年生的可用日期作取样的参考依据(因多年生植物每年开花日期相去不远),主要还是用生殖器官形成时的外部形态为指标。以下举几种植物为例:

水稻 常以叶枕距作为指标,当叶枕距为0时,减数分裂处于盛期或偏于末期。我国南方地区,当叶枕距为-3至0时为观察减数分裂最佳期,持续时间1.5天左右。如以颖花长为标准,则一般颖花达全长的45~60%时,均可观察到减数分裂。

小麦 旗叶与下一叶的叶枕距,北京地区为3~5cm,穗长约为3~4cm左右比较合适。每一麦穗一般以中部略偏上的小穗最先发育,依次向下向上推移。每一小穗中各小花的发育则由基部向顶推移。如以花药为指标,则长为1~1.5mm,花药为黄绿色时较适宜。

玉米 植株形成喇叭口前一周内,即进入减数分裂。这时以手指由喇叭口顺序向下捏挤叶鞘,捏及有松软感觉时即是雄花序的所在部位。以刀片纵向划一切口,取出数条花序分枝检查,如先端小穗颖长3~4mm时,即可取样。整个雄花序的发育顺序是由顶部向基部推移,每一分枝以中部偏上的小穗先发育,依次上下推移。花药长2~3mm时适宜。

棉花 现蕾不久便进入减数分裂期。以陆地棉为例,花萼与花瓣等长,整个花蕾长度在3~5mm时取样比较适合。

2. 制片步骤

(1)预处理 同 N. Kurata 等(1978)制片技术。

(2)固定 用 Carnoy 液固定,一般时间为24小时。固定后用95%乙醇冲洗数次,然后放入70%的乙醇中,放冰箱内备用。

(3)解离 用1~2%果胶酶和纤维素酶混合酶(纤维素酶和果胶酶各占1~2%)处理2小时左右,去除细胞壁。

(4)染色制片 将解离后的材料放进蒸馏水中,20℃处理5~10分钟,洗去酶液。将洗去酶液的材料放在清洁载片上,在材料上滴上少量改良的苯酚品红,用解剖针涂片,再滴少量染液,用镊子夹去大块残留物。盖上盖片,再盖上一块滤纸,用解剖针头轻轻敲打或用大拇指下压,使细胞散开。然后在酒精灯火焰上掠过2~3次即完成制片。

(5)镜检、照相。

也可不经预处理和不用酶解离,固定后直接用改良的苯酚品红染色涂片(用解剖针或解剖刀,切开花药,让花粉粒溢出,滴上少量染液使细胞散开、展平,或先滴上染液,后切开花药)。这样的程序效果极佳,而且十分简便。但固定后,必须用乙醇洗掉残留的固定液才能得到好的分裂相。

改良的苯酚品红染色液的配制方法是:

取3g碱性品红,溶解在100ml的70%乙醇中配成母液A(可长期保存)。

取母液A 10ml加入90ml的5%苯酚水溶液,配成母液B。

取45ml的母液B,加入6ml冰醋酸和6ml 37%的福尔马林,此液即苯酚品红染色液。

取10ml苯酚品红染色液,加入90ml的45%冰醋酸和1g山梨醇(不能多,否则会出现结晶,影响效果),此液即为改良苯酚品红染色液。

此改良液不使细胞质染色,而染色体染成深紫色。比孚尔根和醋酸洋红都要好,是近代最佳核染色剂。

三、酶解植物细胞改良苯酚品红染色制片法(郑国锷,私人通信)

本法适合于根尖、幼芽和愈伤组织。此法中酶解是对压片的改进,用改良的苯酚品红是对醋酸洋红和孚尔根染液染色的改进。实验步骤如下:

1. 取样

用刀片把根尖(或幼芽、愈伤组织)切下,立即投入装有饱和对二氯苯溶液(或 0.004M 8-羟基喹啉)的小指管中,预处理 3~4 小时,取出根尖,用水冲 1~2 次,再把根尖在 3 份乙醇(95%),1 份冰醋酸中固定(若长期保存可将根尖等移入 70%乙醇中)。

2. 酶处理

将固定的材料用 0.1M 醋酸钠洗 2 次,然后放入酶液中(以 0.1M 醋酸钠溶液, pH4.5 为溶剂。加入 2%纤维素酶和 0.5%果胶酶配成混合酶液),在 25℃温箱中处理 3 小时左右,即可将材料从酶液中取出,用 0.1M 醋酸钠洗 2 次,再放到 60℃ 0.1N HCl 中水解 10 分钟,最后用 45%醋酸清洗根尖(或幼芽、愈伤组织)。

3. 染色及制片

将经过酶处理的材料,放在清洁的载玻片上,若是根,则切去伸长区部分,留下根尖分生组织,加上一滴改良苯酚品红染色液,盖上盖片,放上吸水纸,轻轻敲打,使细胞均匀分散。镜检,然后制成临时封片,或用冷冻脱片法(用 CO₂ 干冰冷冻),用刀片将盖片慢慢揭开,盖片和载片同时放置于 37℃左右温箱中烘干,取出并在二甲苯中浸泡 10~20 分钟,用中性树胶封片。

四、Wright 染色剂制片法(细胞生物学杂志,1985,7(1): 33~34)

此法分染效果比改良的苯酚品红分染效果更佳。

1. Wright 染色剂配方

Wright 染料粉 0.1g, 甲醇(无丙酮存在)7.5ml, 二者混合 1~2 天后, 使染料充分溶于甲醇中, 再进行过滤才可应用(应装入棕色滴瓶中备用)。

2. 染色操作步骤

以蚕豆为材料举例。

(1) 预处理 在上午 9 时左右剪下蚕豆根尖 1~2mm 置于饱和对二氯苯溶液中, 在 5℃ 以下处理 3 小时。

(2) 固定 移去饱和对二氯苯溶液, 用蒸馏水冲洗数次, 用吸水纸将水分吸干, 再加入无水乙醇: 冰醋酸(3: 1)固定液固定 2~4 小时。

(3) 解离 弃去固定液, 用蒸馏水冲洗数次, 吸干水分, 加入 1N HCl: 45% 醋酸(2: 1)溶液, 在 20~25℃ 下解离 10~15 分钟。

(4) 染色 弃去解离液, 用 50% 乙醇洗一次, 再用蒸馏水清洗, 吸干水分, 加入配制好的 Wright 染色剂, 使全部根尖浸泡于溶液中, 时间为 1~2 小时。

(5) 压片 弃去染液, 用 45% 醋酸洗一次, 然后将材料置于载玻片上, 并滴上一滴 45% 醋酸, 用镊子将根尖捣碎使其分散于 45% 醋酸溶液中, 盖上盖玻片, 用镊子头或解剖针头轻轻敲打, 使细胞散开, 盖上吸水纸, 左手按住吸水纸并固定其下的盖片, 勿使其移动, 用右手拇指或铅笔橡皮头端对准根尖部位适当施加压力, 使材料压成一均匀薄层。为了增强染色