

摘 要

本文介绍一种改进的结合组织化学和生物化学的电泳方法,用此方法对神经组织中微量蛋白质进行定性、定量和定位的分析。结果表明在不同发育阶段中,鸡胚腰段脊髓中绝大多数蛋白区带表现为色度上的深浅变化,少数区带随发育而丢失或新生,脊髓背腹区域的蛋白区带非常相似,而酸性糖蛋白却表现为腹部多于背部。此外,还分析了鸡胚和鸡鹑的7种组织中蛋白质区带的差异。

参 考 文 献

[1] Bonte, W. et al., 1981, *Science Tools*, 28:1.

- [2] Saravis, C. A. et al., 1979, *J. Immunol. Methods*, 29:97.
- [3] D' Andrea, A. L. et al., 1985, *Electroresis*, 6:468.
- [4] Thompson B. J. et al., 1982, *Electrophoresis*, 3:307.
- [5] 陈世雄, 1984, *实验生物学报* 17:161.
- [6] Chrembach, A. et al., 1973, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 209:44.
- [7] Göng, A. et al., 1985, *Science Tools*, 32:5.
- [8] Michial, J. et al., 1983, *Electrophoresis*, 4:97.
- [9] 翟森, 1981, *神经生物化学* pp. 54, 科学出版社出版.
- [10] Dubray, G. et al., 1982, *Anal. Biochem.*, 119:325.

用放线菌素D法在植物染色体上显示高分辨带*

卫俊智 朱凤媛

(中国农业科学院作物育种栽培研究所)

自从染色体显带技术被引入植物研究中来,先后发展了多种C带、N带和Q带等显带程序,使染色体显带技术在植物的核型分析、亲缘关系鉴定、染色体变异的分析、外源染色体的识别等方面得以应用,推动了植物细胞遗传学的发展。但是,这些显带程序所显示的带纹一般均较简单,远不能与高等脊椎动物中的高分辨G带相媲美,这就大大限制了染色体显带技术在植物细胞遗传学研究和植物育种工作中的进一步应用。

近几年来,国内外许多研究者在植物染色体G显带或高分辨显带的理论^[1,2]和实践上^[3-11]进行了大量有益的探索,并取得了一定的结果。但至今在植物染色体显带中,仍没有得到象高等脊椎动物的G带那样成功的显带方法,有必要对显带方法进行更深入而广泛的探索。近来,AMD(放线菌素D)在动物染色体研究中的应用越来越普遍,本研究改良了AMD

法并用该方法在多种植物染色体上进行了高分辨显带的探索。

材 料 与 方 法

一、材料

本研究中所用的实验材料有一粒小麦(*Triticum monococcum*, $2n=14$)、圆锥小麦(*Triticum turgidum*, $2n=28$)、大麦(*Hordeum vulgare*, $2n=14$)、玉米(*Zea mays*, $2n=20$)、黑麦(*Secale cereale*, $2n=14$)等植物的种子根尖。麦类植物取初生根,玉米取次生根。

二、方法

1. 将0.5—1.5 cm的根尖置于终浓度为5—10 $\mu\text{g/ml}$ 的AMD(Fluka AG公司,瑞士)和0.025%秋水仙素的混合溶液中,25°C下黑暗中进行预处理。

2. 用蒸馏水冲洗根尖,然后将根尖置于35°C预热的Ohnuki's低渗液中(0.055 mol/L KCl, 0.055 mol/L NaNO₃和0.055 mol/L CH₃COONa,用时以10:5:2比例混合),25°C黑暗中低渗处理30—60分钟。

* 农业部农02—01—02“七五”重点科研项目,

3. 蒸馏水冲洗后, 将根尖于 2.5% 的果胶酶 (Serva 公司, 西德) 和纤维素酶 (Yakult 公司, 日本) 的混合溶液中 25°C 酶解 2 小时左右。

4. 根尖洗后于新鲜的 3:1 甲醇冰乙酸固定液中固定 2 小时以上。

5. 取出固定过的根尖, 分别置于干净载玻片上, 滴上固定液, 把根尖捣碎后涂片。

6. 标本气干后于 4:1 的 Wright-Giemsa 液中染色至适度。

7. 显微镜下观察并照像。

结 果

用上述方法在实验中多数植物都成功地显示了高分辨带纹。一般在前期、晚前期染色体上显示的带纹非常丰富, 但在此时期, 染色体均较长, 互相缠绕较为严重, 不易分散, 因而不利于带纹分析。而到中期, 染色体收缩过于紧密, 带纹趋于合并, 故不易分辨。则一般取早中期染色体进行分析较为适宜, 此期染色体易分散, 其带纹虽不及前期和晚前期时多, 但还可清楚辨认。

一粒小麦早中期所有染色体上都显示较多清晰带纹(图版 I, 1), 其整个染色体组约显示 140 余条带纹。圆锥小麦的每条染色体显示 10 条左右带纹(图版 I, 2)。大麦的早中期染色体上显示较多带纹, 其染色体组有近 200 条带, 在中期, 由于染色体的收缩, 相邻带纹合并而辨认不出带纹(图版图 3)。玉米的晚前期和早中期染色体上除了显示近端部的异染色质带外, 还显示许多中间带纹(图版图 4)。黑麦的染色体从晚前期到早中期再到中期都可显示高分辨带纹, 染色体越靠近中期, 其上所显示的带纹数目越少(图版图 5)。显带的染色体经局部放大, 可清晰地看到两条染色单体上的对称带纹, 非常易于进行带纹分析(图版图 6)。

讨 论

一、关于植物染色体较难显示高分辨带或 G 带的原因

到目前为止, 从对植物染色体显带技术研究的结果可以看到, 植物中的高分辨带或 G 带技术比植物中的 C 带、N 带和高等脊椎动物中的 G 带技术都要困难得多。主要表现在: (1) 不易找到适宜的显带程序; (2) 显带程序中某些处理的条件较难掌握; (3) 显带分裂相占总分裂相的比例不高; (4) 一般中期染色体上很难观察到清晰的带纹, 早中期和晚前期染色体虽可显清晰带纹, 但这些时期染色体较长, 对制片和分析都不利; (5) 带纹显示的重复性及稳定性较差等等。

Greilhuber(1977)曾认为, 植物染色体上不显 G 带主要是其含有较高等脊椎动物更高浓缩程度的 DNA 所致。这意味着, 可能在一些 DNA 含量少而染色体体积大的植物中显带成功。Drewry (1982)也指出, 红松的染色体能显 G 带(但只提供 24 条染色体中 4 条的带型)而其他植物的不能, 主要是由于其他植物染色体较红松染色体收缩程度要高的缘故。然而, Anderson 等(1982)通过严格实验所获得的结果表明, 动植物染色体有大致相同的 DNA 量与染色体长度及 DNA 量与染色体体积之比值, 这表明动植物染色体在浓缩程度上并无大的差异, 从而否定了 Greilhuber 的假说。在本研究中, 我们选择了 DNA 含量很低的亚麻 (*Linum usitatissimum*)、凤仙 (*Impatiens balsamina*) 等和 DNA 含量较高的大麦、黑麦、小麦等植物进行高分辨显带实验, 结果表明, DNA 含量与带纹显示无密切关系。

作者认为, 植物染色体较难显示高分辨带或 G 带, 主要有两方面原因。一方面是由于植物染色体和动物染色体可能在碱基分布上有差异。目前关于动物染色体的显带机制认为主要与染色体上碱基分布有关: 显 G 带和 Q 带的区域是富含 A-T 碱基对的区域, 显 R 带的区域是富含 G-C 碱基对的区域^[12]。虽然植物 DNA 中总的 A-T 或 G-C 碱基对所占的比例与高等脊椎动物的无大的差异, 但这可能是植物染色体碱基组成分布的区域性差异不及高等脊椎动物

中的显著,即植物中富含 A-T 碱基对和富含 G-C 碱基对的 DNA 区域不像高等脊椎动物中的那么集中,这样其带区和带间区的差异就不够明显,则一般不易被高等脊椎动物中的 G 带程序所显示。这同对低等脊椎动物的看法^[13]相一致。

另一方面还有技术上的原因。(1)植物分带中一般处理根尖,而根尖细胞分裂的高度同步化较困难,这给得到较多的适宜时期的分裂相带来不便。(2)由于植物细胞中存在细胞壁,在对其细胞酶解、酸解来解离或软化细胞壁过程中,往往对染色体造成不利影响,使之不易显带。(3)用涂片法和滴片法得到的染色体较压片法得到的易显带,但前两种制片方法不易掌握。(4)对显带过程中一些理化作用的机制了解得很少,从而给技术上的改进带来困难。

二、关于 AMD 显带法

AMD 是依赖于 DNA 的 RNA 合成酶的强抑制物,它是通过其色素环与 DNA 分子小沟中鸟嘌呤以氢键结合,抑制了 RNA 酶活性而阻断 mRNA 的合成的。Arrighi 等(1965)^[14]首次用 AMD 处理中国仓鼠染色体,发现染色体有解螺旋和断裂两种异常现象。Shafer (1973)^[15]用 AMD 处理人的淋巴细胞,标本空气干燥后,不经其他任何处理, Giemsa 染色就可产生 G 带。Hsu 等(1973)^[16]用 AMD 也使中国仓鼠染色体显出 G 带。由于这种显带方法是在制作玻片标本之前处理培养细胞,简便易行,则 AMD 法经不断改进,在人类染色体显带中应用越来越普遍,且显示出分辨率越来越高的 G 带带纹^[17-20]。

施立明和徐道党(未发表)将 AMD 法引入植物染色体显带中。经改良后,朱凤绥等^[6]在大麦、张自立等^[8]在黑麦、詹铁生等^[11]在玉米等植物中先后取得初步成功。但这些方法均较复杂且不易掌握,本研究对 AMD 法进行了进一步的改良。通过对 AMD 预处理的方式、浓度及时间的实验探索,结果表明,AMD 与秋水仙素共同作用的一次性预处理,预处理中

AMD 浓度在 5—10 $\mu\text{g/ml}$ 范围内和预处理时间与该物种分生组织细胞分裂 G₂ 期持续时间相接近时效果最好。AMD 处理浓度过高或处理时间过长都会造成分裂相减少和染色体异常现象严重而不利于带纹显示。同时还简化了制片、染色等处理,染色体标本制好后不需再经其他处理, Wright-Giemsa 染色后即可显带。另外,在某些染色体数目较少的植物(如大麦、黑麦等)中,还可以省去低渗和/或酶解的步骤。预处理后,立即固定,再进行制片、染色,使程序更为简便实用。本方法除在本文中提到的 5 种植物外,还在普通小麦、节节麦、亚麻、水稻等植物的染色体高分辨显带实验中初获成功。

三、植物染色体高分辨显带技术的前景

目前虽然许多研究者在植物染色体高分辨显带或 G 显带上已取得了初步成功,但该技术还不十分成熟,还需要根据存在的问题及其原因做进一步的研究探索。

首先,设法抑制染色体过度浓缩,使染色体具有适宜的长度,同时还必须能使染色体发生纵向分化,除 AMD 外,还有 BrdU、Hoechst 33258、吖啶橙、溴化乙锭等化学药物可以进行实验。

其次,对低渗、解离、制片、染色等进行探索,尽可能避免对染色体过多过强的理化作用,以得到几个重复性较好,较为实用的标准化流程。

第三,染色体带纹特征化。不仅能使染色体显示较多的带,而且还要使不同染色体的带纹具有不同的特征,这才能为进一步应用提供可能性。

最后,带纹数目数量化,带型模式化,制做出不同植物的标准带型,以促进该技术在植物遗传育种研究工作中的早日应用。

摘 要

本文探索了植物染色体高分辨显带中的放线菌素 D (actinomycin D 简称 AM D)法,并

报道了该方法在一粒小麦、圆锥小麦、大麦、玉米、黑麦等植物染色体上进行高分辨显带的结果。AMD 法的流程主要包括:放线菌素 D 和秋水仙素共同预处理植物种子根尖, Ohnuki's 液低渗, 纤维素酶和果胶酶酶解, 3:1 的甲醇冰乙酸固定液固定, 涂片法制片和 Wright-Giemsa 染色。该方法在多数实验植物的染色体上均显示出丰富的高分辨带纹。在早中期, 多数染色体可显示出 10 条左右的清晰带纹。文章还分析了植物染色体较难显示高分辨带或 G 带的原因, 并讨论了放线菌素 D 在显带中的应用。

参 考 文 献

- [1] Greilhuber, J., 1977, *Theor. Appl. Genet.* 50:121-124.
- [2] Anderson, L. K. et al., 1982, *Exp. Cell Res.*, 138:433-436.
- [3] Drewry, A., 1982, *J. Heredity*, 73:305-306.
- [4] Murata, K. and T. J. Orton, 1984, *J. Heredity*, 75:225-228
- [5] 朱凤绥等, 1986, 作物学报, 12:213-214.
- [6] 陈瑞阳等, 1986, 武汉植物学研究, 4:111-117.
- [7] 陈瑞阳等, 1987, 植物学报, 29:341-346.
- [8] 张自立等, 1986, 植物学报, 28:595-598.
- [9] 宋运淳等, 1987, 遗传学报, 14(6):424-427.
- [10] 卫俊智等, 1987, 麦类植物染色体高分辨显带, 《中国的遗传学研究》, 湖南科技出版社, 132-133.
- [11] 詹铁生等, 1987, 植物学报, 29:465-468.
- [12] Coming, D. E., 1987, *Ann. Rev. Genet.*, 12:25-46.
- [13] 洪云汉等, 1985, 遗传学报, 12:67-71.
- [14] Arrighi, F. E. and T. C. Hsu, 1965, *Exp. Cell Res.*, 39:305-308.
- [15] Shafer, D. A., 1973, *Lancet*, 1:828-829.
- [16] Hsu, T. C. et al., 1973, *Exp. cell Res.* 79:484-487.
- [17] Yu, R. L. et al., 1981, *Cytogenet. Cell Genet.*, 31:111-114.
- [18] Yunis, J. J., 1976, *Science*, 191:1268-1270.
- [19] Yunis, J. J., 1981, *Hum. Genet.*, 56:293-298.
- [20] Rybak, J. et al., 1982, *Hum. Genet.*, 60:328-333.

介绍一种稳定的改良三铅染色液*

陈文列 钟秀容

(福州福建医学院电镜室)

用于电镜超薄切片的铅染液报道甚多, 如氢氧化铅^[1]、柠檬酸铅^[2]、酒石酸铅^[3]和三铅染液^[4]等。它们共同的缺点是较易形成碳酸铅沉淀, 以致染液难以长期保存, 且染色时又需采取特殊措施防止切片污染。最近, Hanaichi 推荐了一种能减缓产生碳酸铅沉淀的改良 Sato 氏铅染液^[5], 经我们使用效果颇佳, 现将我们配制与使用该染液的方法介绍于下。

染液配制与染色方法

一、煅烧柠檬酸铅 将柠檬酸铅[枸橼酸铅, $(C_6H_5O_7)_2Pb_3 \cdot 3H_2O$]置于坩埚, 在箱式电阻炉(马孚炉, S_x-4-10型, 4 kW)中, 于

250℃煅烧约 45—60 分钟, 至白色结晶转变为浅棕黄色粉末。

二、铅染液配制 取煅烧的柠檬酸铅 0.20 g、硝酸铅 0.15 g、醋酸铅 0.15 g、柠檬酸钠 1.00 g、去 CO₂ 蒸馏水 41 ml, 放入 50 ml 容量瓶中, 剧烈振摇 15—30 分钟, 置超声波发生器中 5—10 分钟, 使之反应充分, 呈淡黄色悬浊液, 再分 3—5 次加入新配的 1 mol/L NaOH (GR 或 AR) 溶液 9 ml (每加一次均应混匀, 并

* 本文承蒙梁平教授指导、审阅, 谨致谢意。

本文曾于 1988 年 10 月在桂林召开的“全国电镜超切制样技术交流会”上交流。